

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA



TERPENÓIDES DE *EUPHORBIA MELLIFERA* AIT. –

Pesquisa de Moduladores do Fenómeno de Multirresistência em
Células Tumerais

Inês Lúcio Paulo Valente
(Licenciada)

Mestrado em Química Farmacêutica e Terapêutica

2007

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA



TERPENÓIDES DE *EUPHORBIA MELLIFERA* AIT. –

Pesquisa de Moduladores do Fenómeno de Multirresistência em
Células Tumerais

Inês Lúcio Paulo Valente
(Licenciada)

Dissertação orientada por:
Professora Doutora Maria José Umbelino Ferreira

Mestrado em Química Farmacêutica e Terapêutica

2007

O trabalho apresentado nesta dissertação foi realizado no Centro de Estudos de Ciências Farmacêuticas, sob a orientação da Professora Doutora Maria José Umbelino Ferreira, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.

Resumo

Nesta dissertação descreve-se, numa primeira fase, o estudo fitoquímico do extracto metanólico da espécie *Euphorbia mellifera* Ait.. Apresentam-se também os resultados dos ensaios efectuados para avaliar a actividade moduladora da multirresistência em células tumorais, mediada pela Pgp, e da actividade anti-proliferativa dos diterpenos isolados.

O extracto metanólico das partes aéreas da planta seca foi fraccionado aplicando várias técnicas cromatográficas, resultando no isolamento de onze compostos:

- ✓ Cinco diterpenos macrocíclicos com o esqueleto do jatrofano, três dos quais novos:
7 β ,8 β ,9 α -triacetoxi-3 β -benzoiloxi-15 β -hidroxi-14-oxo-2 β H,13 α H-jatrofa-5*E*,11*E*-dieno (eufomelifarina), 7 β ,8 β ,9 α ,14 β ,15 β -pentacetoxi-3 β -benzoiloxi-2 α H,13 α H-jatrofa-5*E*,11*E*-dieno (eufomelifereno A) e 7 β ,8 β ,9 α ,14 β -tetracetoxi-3 β -benzoiloxi-15 β -hidroxi-2 α H,13 α H-jatrofa-5*E*,11*E*-dieno (eufomelifereno B); e dois já reportados na literatura: 6 β ,7 β ,8 β ,9 α ,15 β -pentacetoxi-3 β -benzoiloxi-14-oxo-2 β H,13 α H-jatrofa-4*E*,11*E*-dieno (serrulatina B) e 7 β ,8 β ,9 α ,15 β -tetracetoxi-3 β -benzoiloxi-6 β -hidroxi-14-oxo-2 β H,13 α H-jatrofa-4*E*,11*E*-dieno;
- ✓ Um diterpeno com o esqueleto do ingenano, o 20-desoxi-ingenol;
- ✓ Quatro triterpenos tetracíclicos, um novo com o esqueleto do *abeo*-tirucalano: 19(10 \rightarrow 9)-*abeo*-8 α ,9 β ,10 α -tirucal-5,25-dieno-3 β ,24-diol (eufotirucalol); dois cicloartanos: cicloart-25-eno-3 β ,24-diol e cicloart-23-eno-3 β ,25-diol; e um *nor*-cicloartano: 27-*nor*-3 β -hidroxicicloart-23-eno-25-ona;
- ✓ Um composto fenólico, o *p*-hidroxibenzaldeído.

A identificação dos compostos baseou-se em métodos físicos e espectroscópicos (infravermelho, espectrometria de massa, RMN unidimensional - ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, DEPT- e bidimensional - ^1H - ^1H -COSY, HMQC, HMBC e NOESY).

A actividade anti-MDR foi avaliada por citometria de fluxo, através do ensaio de acumulação intracelular da rodamina 123 em células L5178 Y de linfoma T de rato transfectadas com o retrovírus pHa MDR1/A, utilizando o verapamil como controlo positivo. Todos os compostos se mostraram activos sendo de salientar os resultados obtidos para o eufomelifereno A que exibiu uma actividade muito superior à do controlo positivo.

Abstract

In the first part of this work, the phytochemical study of the methanolic extract of *Euphorbia mellifera* Ait is reported. The ability of the isolated diterpenes to modulate the transport activity of P-glycoprotein and their anti-proliferative activity are also presented.

The methanolic extract of the dried aerial parts was fraccionated through various chromatographic techniques, thereby resulting in the isolation of eleven compounds:

- ✓ Five macrocyclic diterpenes with the jatrophae skeleton, three of which are new: 7 β ,8 β ,9 α -triacetoxy-3 β -benzoyloxy-15 β -hydroxy-14-oxo-2 β H,13 α H-jatropha-5*E*,11*E*-diene (eufomelifarina), 7 β ,8 β ,9 α ,14 β ,15 β -pentacetoxy-3 β -benzoyloxy-2 α H,13 α H-jatropha-5*E*,11*E*-diene (eufomelifereno A) e 7 β ,8 β ,9 α ,14 β -tetracetoxy-3 β -benzoyloxy-15 β -hydroxy-2 α H,13 α H-jatropha-5*E*,11*E*-diene (eufomelifereno B); and two previously reported: 6 β ,7 β ,8 β ,9 α ,15 β -pentacetoxy-3 β -benzoyloxy-14-oxo-2 β H,13 α H-jatropha-4*E*,11*E*-diene (serrulatin B) and 7 β ,8 β ,9 α ,15 β -tetracetoxy-3 β -benzoyloxy-6 β -hydroxy-14-oxo-2 β H,13 α H-jatropha-4*E*,11*E*-diene;
- ✓ One diterpene with the ingenane skeleton, the 20-deoxy-ingenol;
- ✓ Four tetracyclic triterpenes, one new with an *abeo*-tirucalane skeleton: 19(10 \rightarrow 9)-*abeo*-8 α ,9 β ,10 α -tirucal-5,25-diene-3 β ,24-diol (eufotirucalol); two cycloartanes: cycloart-25-ene-3 β ,24-diol and cycloart-23-ene-3 β ,25-diol; and one *nor*-cycloartane: 27-*nor*-3 β -hydroxycycloart-23-ene-25-one;
- ✓ One phenolic compound, *p*-hydroxybenzaldehyde.

The identification of the compounds was based on physical and spectroscopic methods (infrared, mass spectrometry, unidimensional- ^1H -NMR, ^{13}C -NMR e DEPT- and bidimensional NMR - ^1H - ^1H -COSY, HMQC, HMBC e NOESY).

The reversal of Pgp mediated MDR was evaluated by flow cytometry, through the rhodamine 123 intracellular accumulation assay in L5178 Y mouse T-lymphoma cells transfected with pHa MDR1/A, using verapamil as the positive control. All compounds were shown to enhance drug retention in the cells by inhibiting the efflux-pump activity, mediated by P-glycoprotein. Eufomelifereno A displayed the highest effect being much more potent than the positive control verapamil.

Palavras Chave

Euphorbia mellifera Ait.

Diterpenos macrocíclicos

Triterpenos

Multirresistência a Fármacos

Actividade anti-proliferativa

Key Words

Euphorbia mellifera Ait.

Macrocyclic diterpenes

Triterpenes

Multidrug Resistance

Anti-proliferative activity

Agradecimentos

Não me seria possível conceber a realização desta dissertação sem o contributo directo ou indirecto que recebi de diversas pessoas, às quais gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos. Gostaria, no entanto, de particularizar algumas dessas pessoas:

Começo por agradecer à pessoa que mais contribuiu para a realização deste trabalho, a Professora Maria José Umbelino, por tudo o que me ensinou durante estes últimos dois anos, pelo tempo e paciência que me dedicou e, sobretudo, pela sua amizade.

Ao Professor Joseph Molnár e à sua equipa do Departamento de Microbiologia e Imunobiologia Médica, da Universidade de Szeged na Hungria, agradeço a disponibilidade para a realização dos ensaios biológicos.

Gostaria ainda de agradecer ao Professor José Ascenso do Instituto Superior Técnico, que possibilitou a obtenção de alguns dos espectros de massa.

Ao Jardim Garcia da Orta por ter disponibilizado a planta e à Professora Teresa Vasconcelos, do Instituto Superior de Agronomia, pela sua identificação apresento os meus sinceros agradecimentos.

Quero agradecer à Dra. Noélia por tudo o que me ensinou, à Professora Margarida pelo apoio e incentivo, à Lena e ao Sr. Francisco por toda a ajuda dispensada; e à Marta e à Cátia pela ajuda, disponibilidade e, acima de tudo, amizade; todos contribuíram para que o tempo dispendido na Faculdade de Farmácia fosse, ao fim ao cabo, um tempo bem passado.

Quero agradecer à Professora Elsa e à Professora Olga pela cedência de instalações e de equipamentos e pelo auxílio técnico e pessoal na fase da extracção, sem esquecer a D. Odete e a D. Fernanda que, comigo, “meteram a mão-na-massa”.

Também ao Professor Higuinaldo Chaves das Neves agradeço profundamente por nunca ter deixado de acreditar em mim e de sempre instigar em mim o ideal de ir mais longe.

Quero agradecer a todo o LQF, em particular à Dra. Maria João Portela, pelo apoio, incentivo e compreensão, à Patrícia por tudo o que me ensinou, ensina e certamente ensinará, à Cristina pela boa-disposição e companheirismo, e a todos os restantes: Natércia, Sara, Emanuel, Dulce e Joana, sem esquecer as *outsiders* Ana Luísa e Sandra, pela amizade.

Ao tio Xico, à prima Joana e ao primo Miguel agradeço a constante preocupação e incentivo. Para a tia Teresa reservo uma especial saudade por já não poder partilhar este momento com ela.

Quero agradecer à família do Mário o incentivo e a compreensão, em particular à Elisa pelos jantares tardios.

Quero agradecer à minha irmã Filipa, pelo apoio não só a superar os tempos difíceis de execução da tese mas em tudo ao longo da minha vida; e por me ter dado, juntamente com o Daniel, uma tão grande fonte de alegria e inspiração, o Lourenço.

Ao Mário, por saber que não é preciso, não vou agradecer até porque seria insuficiente perante o apoio logístico, informático mas mais importante que isso, pessoal e psicológico que me providenciou.

Por último e como alguém disse, os últimos são os primeiros, quero agradecer à minha Mãe e ao meu Pai pelo seu amor e apoio incondicionais e por tanta coisa que todas juntas não caberiam nesta folha e por isso resumo a: por TUDO!

Abreviaturas e simbologia

ABC	<i><u>A</u>TP <u>B</u>inding <u>C</u>assette</i>
Ac	acetilo
AcOEt	acetato de etilo
$[\alpha]_D^{20}$	rotação específica determinada a 20°C
ATP	Adenosina tri-fosfato
ADME	<u>A</u> bsorção, <u>D</u> istribuição, <u>M</u> etabolização e <u>E</u> xcreção
ADP	adenosina di-fosfato
BCRP	<i><u>B</u>reast <u>C</u>ancer <u>R</u>elated <u>P</u>rotein</i>
<i>bs</i>	singuleto largo (<i><u>b</u>road <u>s</u>inglet</i>)
Bz	benzoílo
cf.	confronte
CoA	coenzima A
^{13}C -RMN	ressonância magnética nuclear de carbono 13
DEPT	espectro de carbono 13 com selecção de carbonos (<i><u>D</u>istortionless <u>E</u>nhancement by <u>P</u>olarization <u>T</u>ransfer</i>)
<i>d</i>	duplete
<i>dd</i>	duplo duplete
DMAPP	dimetilalil di-fosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i><u>D</u>eoxyribo<u>N</u>ucleic <u>A</u>cid</i>)
EIMS	espectroscopia de massa com ionização por impacto electrónico (<i><u>E</u>lectron <u>I</u>mpact <u>M</u>ass <u>S</u>pectroscopy</i>)
ESI-MS	<i><u>E</u>lectro<u>S</u>pray <u>I</u>onisation <u>M</u>ass</i>
<i>et al</i>	e outros (autores)
FAB	bombardeamento de átomos rápidos
FAR	razão da actividade de fluorescência
FL-1	intensidade de fluorescência média
FPP	farnesil pirofosfato
FSC	<i><u>f</u>orward <u>s</u>catter</i>
δ	deslocamento químico
GGPP	geranilgeranil pirofosfato
GPP	geranil pirofosfato
GSH	glutathiona

GST	glutathione <i>S</i> -transferase
Hex	hexano
¹ H- ¹ H COSY	correlação próton-próton (<u>C</u> orrelation <u>S</u> pectroscop <u>Y</u>)
¹ H-RMN	ressonância magnética nuclear de próton
HMBC	hetero-correlação ¹ H- ¹³ C a duas e três ligações (<u>H</u> eteronuclear <u>M</u> ultiple <u>B</u> ond <u>C</u> orrelation)
HMQC	hetero-correlação com detecção de próton (<u>H</u> eteronuclear <u>M</u> ultiple <u>Q</u> uantum <u>C</u> orrelation)
HPLC	cromatografia líquida de alta pressão (<u>H</u> igh <u>P</u> ressure <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography)
Hz	hertz
ID ₅₀	concentração de composto à qual se verifica uma inibição de 50% do crescimento celular
IPP	isopentenil di-fosfato
IV	infravermelho
<i>J</i>	constante de acoplamento
KDa	Kilo Dalton
LRP	<u>L</u> ung <u>C</u> ancer <u>R</u> elated <u>P</u> rotein
<i>m</i>	múltiplo
MDR	<u>M</u> ulti <u>D</u> rug <u>R</u> esistance
Me	metilo
MeOD	metanol deuterado
MeOH	metanol
MHz	megahertz
μM	micromolar
MRP	<u>M</u> ultidrug <u>R</u> esistance related <u>P</u> rotein
m/z	relação massa/carga
nm	nanómetro
nM	nanomolar
NOESY	espectroscopia de efeito nuclear de overhauser (<u>N</u> uclear <u>O</u> verhauser <u>E</u> ffect <u>S</u> pectroscop <u>Y</u>)
NPP	nerilpirofosfato
Pgp	Glicoproteína P (<u>P</u> - <u>g</u> lycoprotein)
PP	pirofosfato

ppm	partes por milhão
QSAR	<i>Quantitative Structure-Activity Relation</i>
rf	factor de retenção
RMN	<u>R</u> essonância <u>M</u> agnética <u>N</u> uclear
SSC	<i>side scatter</i>
<i>t</i>	tripeto
TLC	Cromatografia em camada fina (<i>Thin Layer Chromatography</i>)
UV	ultravioleta

ÍNDICE

Preâmbulo	1
1 Introdução	3
1.1 <i>O género Euphorbia</i>	4
1.1.1 Terpenos	5
1.1.1.1 Diterpenos – Aspectos biogenéticos	8
1.1.1.2 Triterpenos – Aspectos biogenéticos	11
1.2 <i>Multirresistência a fármacos anticancerígenos</i>	14
1.2.1 Mecanismos de multirresistência a fármacos anticancerígenos	14
1.2.1.1 Mecanismos de resistência não-celulares	15
1.2.1.2 Mecanismos de resistência celulares	15
1.2.2 Modulação dos mecanismos de multirresistência a fármacos	22
1.2.2.1 Modulação da MDR mediada pela Pgp	22
1.2.2.2 Modulação da MDR mediada pela Pgp e pela MRP	26
1.2.3 Obstáculos ao desenvolvimento da modulação dos mecanismos de multirresistência	28
1.2.4 Diterpenos com actividade moduladora da MDR	29
1.2.5 Triterpenos com actividade moduladora da MDR	31
2 Apresentação e discussão dos resultados	33
2.1 <i>Estudo fitoquímico</i>	35
2.1.1 Diterpenos com o esqueleto do jatrofano	35
2.1.1.1 Eufomeliferina (7 β ,8 β ,9 α -triacetoxi-3 β -benzoiloxi-15 β -hidroxi-14-oxo-2 β H,13 α H-jatrofa-5E,11E-dieno)	35
2.1.1.2 Eufomelifereno A (7 β ,8 β ,9 α ,14 β ,15 β -pentacetoxi-3 β -benzoiloxi-2 α H,13 α H-jatrofa-5E,11E-dieno)	41
2.1.1.3 Eufomelifereno B (7 β ,8 β ,9 α ,14 β -tetracetoxi-3 β -benzoiloxi-15 β -hidroxi-2 α H,13 α H-jatrofa-5E,11E-dieno)	47
2.1.1.4 Serrulatina B (6 β ,7 β ,8 β ,9 α ,15 β -pentacetoxi-3 β -benzoiloxi-14-oxo-2 β H,3 α H-jatrofa-4E,11E-dieno)	51

2.1.1.5	7 β ,8 β ,9 α ,15 β -tetracetoxi-3 β -benzoiloxi-6 β -hidroxi-14-oxo-2 β H,13 α H-jatrofa-4E,11E-dieno	54
2.1.2	20-desoxi-ingenol.....	58
2.1.3	Triterpenos tetracíclicos.....	61
2.1.3.1	Eufotirucalol (19(10 \rightarrow 9)-abeo-8 α ,9 β ,10 α -tirucal-5,25-dieno-3 β ,24-diol)	61
2.1.3.2	Cicloart-25-eno-3 β ,24-diol.....	68
2.1.3.3	Cicloart-23-eno-3 β ,25-diol.....	71
2.1.3.4	27-nor-3 β -hidroxicicloart-23-eno-25-ona.....	75
2.1.4	p-Hidroxibenzaldeído	77
2.2	<i>Ensaio biológico</i>	80
2.2.1	Modulação da multirresistência em células de linfoma de rato.....	80
2.2.2	Actividade anti-proliferativa.....	83
3	Procedimento experimental	85
3.1	<i>Equipamentos e técnicas gerais</i>	85
3.1.1	Equipamento e técnicas de caracterização/identificação estrutural.....	85
3.1.2	Técnicas de separação cromatográfica.....	86
3.2	<i>Estudo fitoquímico da Euphorbia mellifera Ait.</i>	87
3.2.1	Processo extractivo.....	87
3.2.2	Fraccionamento do extracto de AcOEt.....	88
3.2.3	Estudo da fracção A.....	90
3.2.4	Estudo da fracção B.....	90
3.2.5	Estudo da fracção C.....	90
3.2.6	Estudo da fracção D	97
3.2.7	Estudo da fracção E.....	107
3.3	<i>Ensaio biológico</i>	108
3.3.1	Modulação da multirresistência mediado pela glicoproteína-P em células tumorais	108
3.3.2	Actividade anti-proliferativa.....	109
4	Conclusões	111
	Bibliografia.....	115

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Alguns exemplares ilustrativos da biodiversidade característica do género <i>Euphorbia</i> .	4
Figura 1.2 – Via do ácido mevalónico para a biossíntese de isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP).	6
Figura 1.3 – Via da desoxi-xilulose para a biossíntese de isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP).	7
Figura 1.4 – Percursos das principais classes de terpenos.	8
Figura 1.5 – Biossíntese de diterpenos macrocíclicos e policíclicos.	9
Figura 1.6 – Ciclização do GGPP e formação do esqueleto dos labdanos e dos <i>ent</i> -labdanos.	10
Figura 1.7 – Possibilidades de ciclização e formação de vários esqueletos policíclicos.	11
Figura 1.8 – Mecanismo de formação do esqualeno.	12
Figura 1.9 – Mecanismos de ciclização do 2,3-epoxi-esqualeno.	13
Figura 1.10 – Árvore filogenética dos transportadores ABC envolvidos na multirresistência a fármacos .	16
Figura 1.11 – Modelo da topologia membranar da Pgp (MDR 1).	17
Figura 1.12 – Modelo do <i>aspirador hidrofóbico</i> para o funcionamento da Pgp (Wiese <i>et al</i> , 2001).	18
Figura 1.13 – Modelo de <i>flipase</i> para o funcionamento da Pgp (Wiese <i>et al</i> , 2001).	18
Figura 1.14 – Modelo da topologia membranar da MRP (MRP 1).	20
Figura 1.15 – Fármacos moduladores da MDR mediada pela Pgp.	26

Figura 1.16 – Fármacos moduladores da MDR por inibição cumulativa da Pgp e MRP.	27
Figura 1.17 – Fármacos moduladores da MDR com reduzidas interações farmacocinéticas.	29
Figura 1.18 – Exemplos de diterpenos com actividade anti-MDR isolados de espécies do género <i>Euphorbia</i> .	30
Figura 1.19 – Exemplos de triterpenos com actividade moduladora da MDR.	32
Figura 2.1 – Exemplar da espécie <i>Euphorbia mellifera</i> Ait. (adaptado de www.dq.fct.unl.pt/qoa/research.html).	33
Figura 2.2 – Compostos triterpénicos e esteroídicos previamente isolados de <i>Euphorbia mellifera</i> Ait.	34
Figura 2.3 – Estrutura da eufomeliferina (1).	35
Figura 2.4 – Fragmentos estruturais (A , B), estabelecidos através das experiências de ¹ H- ¹ H COSY e HMQC, da eufomeliferina.	38
Figura 2.5 – Principais efeitos de NOE da eufomeliferina.	40
Figura 2.6 – Estrutura do eufomelifereno A (2).	41
Figura 2.7 – Fragmentos estruturais (A , B), estabelecidos através das experiências de ¹ H- ¹ H COSY e HMQC, do eufomelifereno A.	42
Figura 2.8 – Principais efeitos de NOE observados para o eufomelifereno A.	45
Figura 2.9 – Estrutura do composto 12 (Hohmann <i>et al</i> , 2003).	46
Figura 2.10 – Estrutura do eufomelifereno B (3).	47
Figura 2.11 – Principais efeitos de NOE observados para o eufomelifereno B.	50
Figura 2.12 – Estrutura da serrulatina B (4).	51
Figura 2.13 – Principais efeitos de NOE observados para a serrulatina B.	52
Figura 2.14 – Estrutura do composto 7β,8β,9α,15β-tetracetoxi-3β-benzoiloxi-6β-hidroxi-14-oxo-2βH,13α-jatrofa-4 <i>E</i> ,11 <i>E</i> -dieno (5).	54

Figura 2.15 – Principais efeitos de NOE observados para o composto 5 .	57
Figura 2.16 – Estrutura do 20-desoxi-ingenol (6).	58
Figura 2.17 – Principais efeitos de NOE observados para o 20-desoxi-ingenol.	61
Figura 2.18 – Estrutura do composto 19(10→9)- <i>abeo</i> -8 α ,9 β ,10 α -tirucal-5,25-dieno-3 β ,24-diol (7).	61
Figura 2.19 – Configuração em C-3 do eufotirucalol.	62
Figura 2.20 – Padrão de fragmentação em espectrometria de massa do eufotirucalol.	63
Figura 2.21 – Estruturas exemplificativas dos esqueletos eufóide (tirucalano e eufano, respectivamente) e cucurbitano.	65
Figura 2.22 – Estrutura do composto cicloart-25-eno-3 β ,24-diol (8).	68
Figura 2.23 – Principais fragmentos originados pela clivagem do cicloart-25-eno-3 β ,24-diol.	69
Figura 2.24 – Estrutura do composto cicloart-23-eno-3 β ,25-diol (9).	71
Figura 2.25 – Estrutura do composto 27- <i>nor</i> -3 β -hidroxicicloart-23-eno-25-ona (10).	75
Figura 2.26 – Estrutura do <i>p</i> -hidroxibenzaldeído (11).	77
Figura 2.27 – Conjugação do carbono carbonílico do <i>p</i> -hidroxibenzaldeído com o anel aromático.	79
Figura 2.28 – Representação esquemática dos parâmetros FSC(●) e SSC (●).	80
Figura 2.29 – Diterpenos sujeitos ao ensaio de acumulação da rodamina 123.	81
Figura 3.1 – Representação esquemática da metodologia utilizada para a obtenção do extracto de AcOEt de <i>Euphorbia mellifera</i> .	88
Figura 3.2 – Representação esquemática das fracções analisadas e respectivos compostos puros obtidos.	89
Figura 3.3 – Representação esquemática do estudo da fracção C3.	91
Figura 3.4 – Representação esquemática do estudo da fracção C4.	95

Figura 3.5 – Representação esquemática do estudo da fracção D3.	98
Figura 3.6 – Representação esquemática do estudo da fracção D4.	101
Figura 3.7 – Representação esquemática do estudo da fracção D5.	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Espectros de ^1H e ^{13}C -RMN e correlações observadas nas experiências ^1H - ^1H COSY e HMBC (C \rightarrow H) da eufomeliferina [400 MHz (^1H), 100,61 MHz (^{13}C), CDCl_3 , δ (ppm) (J em Hz)].	37
Tabela 2.2 – Principais interações de NOE observadas para a eufomeliferina.	40
Tabela 2.3 – Espectros de ^1H e ^{13}C -RMN e correlações observadas nas experiências ^1H - ^1H COSY e HMBC (C \rightarrow H) do eufomelifereno A [400 MHz (^1H), 100,61 MHz (^{13}C), CDCl_3 , δ (ppm) (J em Hz)].	43
Tabela 2.4 – Principais interações de NOE observadas para o eufomelifereno A.	44
Tabela 2.5 – Estudo comparativo dos desvios químicos e constantes de acoplamento (δ_{H} e J).	46
Tabela 2.6 – Estudo comparativo dos desvios químicos (δ_{C}).	46
Tabela 2.7 – Comparação dos desvios químicos do eufomelifereno A (2) e eufomelifereno B (3).	48
Tabela 2.8 – Espectros de ^1H e ^{13}C -RMN e correlações observadas nas experiências ^1H - ^1H COSY e HMBC (C \rightarrow H) do eufomelifereno B [400 MHz (^1H), 100,61 MHz (^{13}C), MeOD , δ (ppm) (J em Hz)].	49
Tabela 2.9 – Principais interações de NOE observadas para o eufomelifereno B.	50
Tabela 2.10 – Espectros de ^1H e ^{13}C -RMN e correlações observadas nas experiências ^1H - ^1H COSY e HMBC (C \rightarrow H) da Serrulatina B [400 MHz (^1H), 100,61 MHz (^{13}C), CDCl_3 , δ (ppm) (J em Hz)].	53
Tabela 2.11 – Principais interações de NOE observadas para a serrulatina B.	54

Tabela 2.12 – Espectros de ^1H e ^{13}C -RMN e correlações observadas nas experiências ^1H - ^1H COSY e HMBC (C→H) do composto 5 [400 MHz (^1H), 100,61 MHz (^{13}C), CDCl_3 , δ (ppm) (J em Hz)].	56
Tabela 2.13 – Comparação dos desvios químicos dos carbonos C-5, C-6, C-7 e C-17 da serrulatina B (4) e do composto 5 .	56
Tabela 2.14 – Principais interações de NOE observadas para o composto 5 .	57
Tabela 2.15 – Espectro de ^1H -RMN do 20-desoxi-ingenol [400 MHz (^1H), CDCl_3 , δ (ppm) (J em Hz)].	59
Tabela 2.16 – Espectro de ^{13}C -RMN e correlações observadas nas experiências ^1H - ^1H COSY e HMBC (C→H) do 20-desoxi-ingenol [400 MHz (^1H), 100,61 MHz (^{13}C), CDCl_3 , δ (ppm) (J em Hz)].	60
Tabela 2.17 – Principais interações de NOE observadas para o composto 6 .	60
Tabela 2.18 – Ângulos diedros e respectivos valores de J característicos de acoplamentos <i>vicinais</i> (3J) em ciclo-hexanos substituídos (Silverstein <i>et al</i> , 1998).	62
Tabela 2.19 – Principais fragmentos originados pela clivagem do eufotirucalol e respectivas intensidades relativas.	64
Tabela 2.20 – Desvios químicos (δ_{H}) dos grupos metilo do esqueleto do composto 7 e analogia com compostos conhecidos.	64
Tabela 2.21 – Comparação entre os desvios químicos observados nos espectros de ^{13}C -RMN para os carbonos C-17, C-20 e C-21 em compostos com os esqueletos do eufano e tirucalano.	66
Tabela 2.22 – Espectro de ^1H -RMN do eufotirucalol [400 MHz (^1H), CDCl_3 , δ (ppm) (J em Hz)].	67
Tabela 2.23 – Espectros de ^{13}C -RMN, DEPT, COSY e HMBC do eufotirucalol [CDCl_3 , δ (ppm), J (Hz)].	67
Tabela 2.24 – Principais fragmentos originados pela clivagem do cicloart-25-eno-3 β ,24-diol e respectivas intensidades relativas.	70

Tabela 2.25 – Espectro de ^1H -RMN do cicloart-25-eno-3 β ,24-diol [CDCl_3 , δ (ppm), J (Hz)].	70
Tabela 2.26 – Espectros de ^{13}C - RMN e DEPT do cicloart-25-eno-3 β ,24-diol [CDCl_3 , δ (ppm), J (Hz)].	71
Tabela 2.27 – Principais fragmentos originados pela clivagem do cicloart-23-eno-3 β ,25-diol e respectivas intensidades relativas.	73
Tabela 2.28 – Espectros de ^1H -RMN do cicloart-23-eno-3 β ,25-diol [CDCl_3 , δ (ppm), J (Hz)].	73
Tabela 2.29 – Espectros de ^{13}C -RMN e DEPT do cicloart-23-eno-3 β ,25-diol [CDCl_3 , δ (ppm), J (Hz)].	74
Tabela 2.30 – Principais fragmentos originados pela clivagem do composto 10 e respectivas intensidades relativas.	76
Tabela 2.31 – Espectro de ^1H -RMN do composto 10 [CDCl_3 , δ (ppm), J (Hz)].	76
Tabela 2.32 – Espectros de ^{13}C -RMN e ^{13}C -DEPT do composto 10 [CDCl_3 , δ (ppm), J (Hz)].	77
Tabela 2.33 – Espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN do <i>p</i> -hidroxibenzaldeído [CDCl_3 , δ (ppm), J (Hz)].	79
Tabela 2.34 – Resultados do ensaio da acumulação intracelular da rodamina 123.	82
Tabela 2.35 – Correlação entre a actividade anti-MDR e as propriedades físico-químicas dos compostos 1 – 6 (número de dadores e aceitadores de ligações de hidrogénio, peso molecular e coeficiente de partilha octanol/água). ^(a)	82
Tabela 2.36 – Resultados do ensaio de actividade antiproliferativa.	83
Tabela 3.1 – Fraccionamento do extracto de AcOEt.	89

P REÂMBULO

Esta dissertação é decorrente de um estudo baseado na espécie *Euphorbia mellifera* Ait., um arbusto perene pertencente à flora da Macaronésia e particularmente abundante Madeira. Este estudo apresenta duas vertentes: o estudo fitoquímico da espécie em questão e consequente isolamento de alguns dos seus metabolitos secundários, e a avaliação do seu efeito na modulação da multirresistência a fármacos (em inglês MDR – **M**ultiple **D**rug **R**esistance) anticancerígenos mediada pela glicoproteína P.

A dissertação é constituída por 4 capítulos, sendo que no primeiro, a Introdução, desenvolve-se a temática da multirresistência a fármacos, a biogénese do tipo de metabolitos secundários isolados (diterpenos e triterpenos) e inclui-se uma breve revisão bibliográfica de compostos do mesmo tipo previamente isolados com actividade moduladora da MDR. No segundo capítulo, procede-se à apresentação e discussão dos resultados. No terceiro capítulo, descreve-se a metodologia adoptada no isolamento e caracterização dos compostos constituintes e na execução dos ensaios biológicos. No quarto e último capítulo, tecem-se algumas conclusões sobre o trabalho desenvolvido.

1 INTRODUÇÃO

A percepção generalizada da natureza como uma interação dinâmica entre os animais, sobre um cenário verdejante inerte, consiste num equívoco redutor da complexidade da vegetação do nosso planeta. Efectivamente, as plantas efectuem todas as funções biológicas erroneamente atribuídas exclusivamente a animais, tais como comunicação e defesa. Para tal, recorrem a sofisticados mecanismos de transmissão de informação, as ferormonas, a um arsenal elaborado de armas mortíferas tais como os terpenos (utilizados, por exemplo, no envenenamento dos solos circundantes para inviabilizar a fixação de competidores) e à síntese de alcalóides que os tornam pouco apetitosos ao palato dos seus predadores (Mans *et al*, 2000).

A síntese destes metabolitos secundários pelas plantas tem vindo a demonstrar o seu valor inigualável ao longo da história da medicina. Uma das áreas na qual o seu valor é incontestável consiste no tratamento do cancro, como pode ser demonstrado pelos alcalóides da Vinca, os taxanos e as camptotecinas provenientes das espécies *Catharantus roseus*, *Taxus brevifolia* e *Camptotheca acuminata*, respectivamente (Mans *et al*, 2000). Outro aspecto ilustrativo da preponderância dos produtos derivados de plantas nesta área terapêutica é o facto de 78% das novas moléculas químicas que surgiram para o combate ao cancro entre 1981 e 2006 serem produtos naturais, seus derivados ou agentes mimetizadores destes (Newman *et al*, 2007).

Na pesquisa de compostos moduladores da multirresistência a fármacos (MDR) anticancerígenos em substratos naturais, os metabolitos secundários das espécies *Euphorbia* têm vindo a ser investigados. Efectivamente, a família das *Euphorbiaceae* é caracterizada por uma capacidade de produção de diterpenos macrocíclicos, compostos altamente funcionalizados e estruturalmente únicos que têm revelado uma elevada eficácia na modulação da MDR (Molnár *et al*, 2006).

1.1 O género *Euphorbia*

A família das *Euphorbiaceae* é constituída por cerca de 300 géneros, nos quais se inclui o género *Euphorbia*. O género *Euphorbia* é o mais vasto da família das *Euphorbiaceae*, sendo constituído por mais de 2000 espécies. A maioria dos seus membros são árvores, arbustos ou ervas e encontram-se distribuídos ao longo da Europa central e do sudoeste europeu (Evans, 1996; Mulzer *et al*, 2005; Jassbi, 2006). A denominação *Euphorbia* deve-se a um cirurgião grego de nome *Euphorbus*, o médico de Juba II, um rei berbere educado pelo império romano e seu aliado, que vulgarizou o uso do latex leitoso das espécies do género *Euphorbia* na medicina (Jassbi, 2006). Ao género *Euphorbia* pertencem espécies muito diversificadas estruturalmente, estando esta biodiversidade bem patente na Figura 1.1 (imagens disponíveis em www.desert-tropicals.com/Plants/Euphorbiaceae/Euphorbia.html; www.mooseycountrygarden.com; www.amherst.edu; www.djamas.com/cactandsucculents.htm a 18 de Novembro de 2007).



Figura 1.1 – Alguns exemplares ilustrativos da biodiversidade característica do género *Euphorbia*.

As plantas do género *Euphorbia* apresentam uma vasta riqueza etnofarmacológica estando, no entanto, várias das suas aplicações terapêuticas já documentadas oficialmente em literatura médica. As plantas deste género têm sido utilizadas ao longo dos tempos para minimizar as dores de dentes, na remoção de verrugas, como purgantes e no tratamento do catarro

brônquico e asmático. Além disso, consistem em constituintes comuns de vários tratamentos para o cancro referenciados na literatura médica grega e romana. No entanto, estas plantas sempre apresentaram uma tal hostilidade perante os organismos que se encontravam no limiar da toxicidade pelo que sempre foram evitadas, senão temidas, e utilizadas rara e cautelosamente (Corea *et al*, 2004; Appendino *et al*, 1998).

Recentemente, a descoberta de compostos terpenóides, provenientes destas plantas, que demonstram elevado poder modulador da MDR abriu novas fronteiras para a investigação das plantas do género *Euphorbia* (Appendino *et al*, 2003; Corea *et al*, 2003a; Corea *et al*, 2003b; Corea *et al*, 2004; Duarte *et al*, 2006; Duarte *et al*, 2007; Hohmann *et al*, 2002; Hohmann *et al*, 2003; Madureira *et al*, 2004a; Madureira *et al*, 2004b; Madureira *et al*, 2004c; Madureira *et al*, 2006; Valente *et al*, 2004; Mulzer *et al*, 2005).

1.1.1 Terpenos

A diversidade estrutural dos terpenos é imensa, incluindo compostos acíclicos, monocíclicos e policíclicos. A sua importância, nomeadamente a nível terapêutico, justifica os numerosos esforços realizados ao longo das últimas quatro décadas no sentido da elucidação da sua biogénese (Eisenreich *et al*, 2004).

Estudos clássicos realizados pelos grupos de investigação de Bloch, Lynen, Cornforth e Popjak (consultar artigos de revisão Bloch, 1992; Qureshi *et al*, 1981; Bach, 1995; Bochar *et al*, 1999) demonstraram que todos os carbonos do isopentenilalil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP) são derivados do acetil-coenzima A (CoA), descoberta que lhes valeu o prémio Nobel em 1964 (Eisenreich *et al*, 2004; Mann, 1994). Como resultado destas investigações e juntamente com estudos enzimáticos mais recentes, é possível descrever, com elevado detalhe, a biogénese da unidade estrutural dos isoprenóides, surgindo desta forma, a teoria da via do ácido mevalónico. A via do ácido mevalónico encontra-se esquematizada na Figura 1.2 (Bruneton, 1993; Eisenreich *et al*, 2004; Mann, 1992; Mann, 1994).

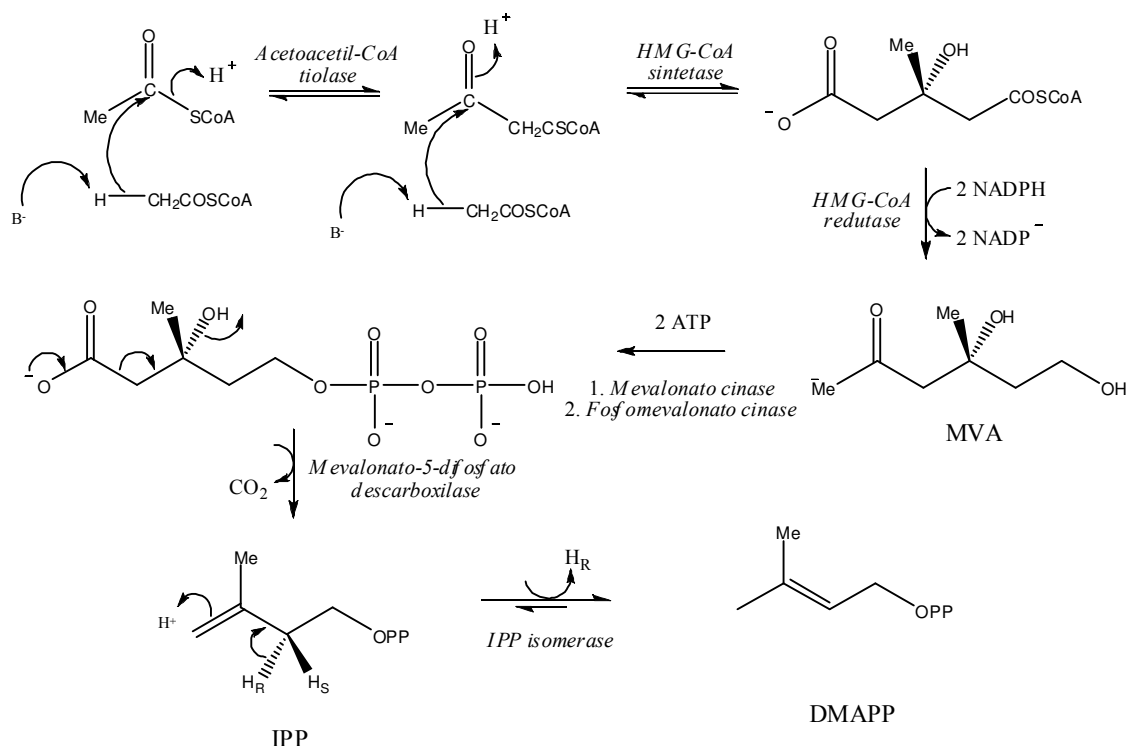


Figura 1.2 – Via do ácido mevalónico para a biossíntese de isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP).

Durante várias décadas, a comunidade científica acreditou que a biossíntese das unidades estruturais isoprénicas ocorria exclusivamente pela via do ácido mevalónico. No entanto, estudos recentes com marcação isotópica de átomos conduziram à obtenção de padrões diferentes dos preconizados pela via do ácido mevalónico. A impossibilidade de conciliar estes factos biossintéticos com esta via orientou vários estudos no sentido de elucidarem uma possível via alternativa. A descoberta decisiva foi a confirmação de que a 1-deoxi-D-xilulose isotopicamente marcada é incorporada por células da *Escherichia coli* na cadeia lateral terpenóide da ubiquinona, com extraordinária eficácia (Eisenreich *et al*, 2004). Efectivamente, tem-se vindo a demonstrar que uma vasta variedade de monoterpenos e diterpenos é predominantemente biossintetizada pela via da deoxi-xilulose ao passo que os esteróides, por sua vez, são-no preferencialmente pela via do ácido mevalónico (Eisenreich *et al*, 2004). A via da deoxi-xilulose encontra-se esquematizada na Figura 1.3 (Eisenreich *et al*, 2004).

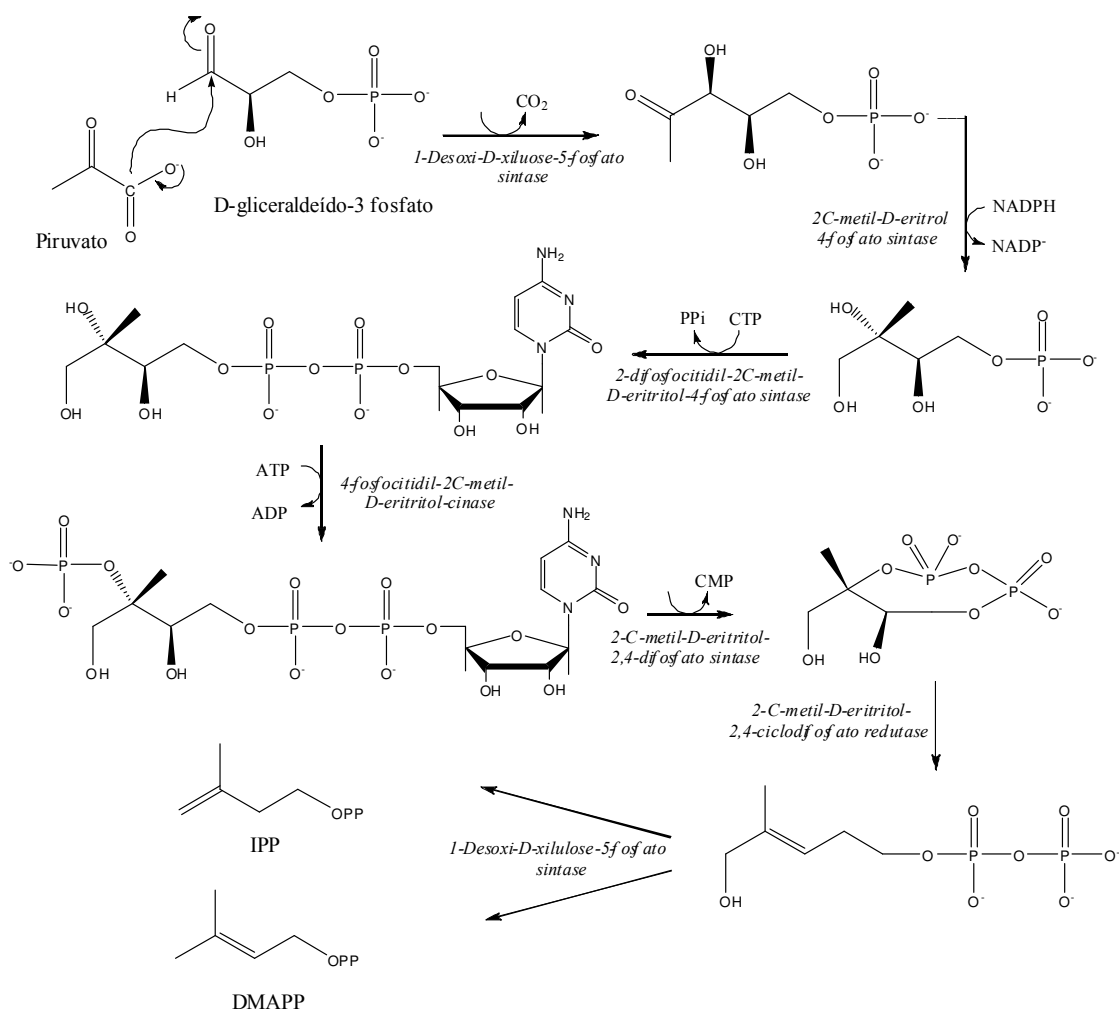


Figura 1.3 – Via da desoxi-xilulose para a biossíntese de isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP).

As unidades C₅ são incorporadas em número variado, segundo um mecanismo típico cabeça-cauda, originando a vasta diversidade de isoprenóides existentes na natureza (cf. Figura 1.4, Bruneton, 1993; Mann, 1992).

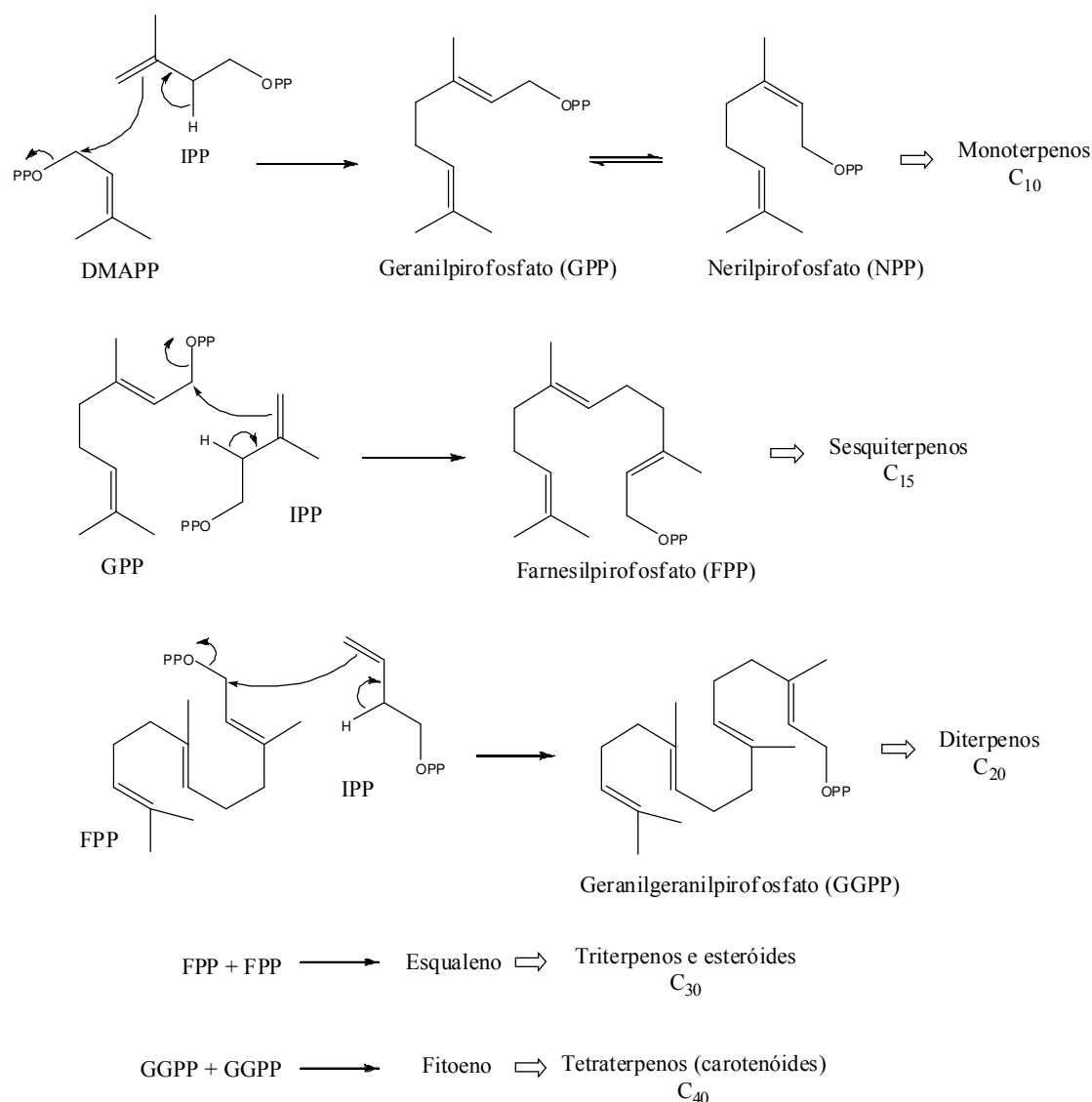


Figura 1.4 – Percursos das principais classes de terpenos.

1.1.1.1 Diterpenos – Aspectos biogénéticos

Os diterpenos são uma família de compostos isoprenóides naturais derivados do 2*E*,6*E*,10*E*-geranylgeranylpirofosfato (cf. Figura 1.4). Embora constituintes típicos de plantas e fungos, também podem ser sintetizados por certos organismos marinhos e insectos (Dey *et al*, 1991).

Existem duas formas possíveis de ciclização do GGPP: a primeira inicia-se com a saída do grupo pirofosfato terminal, conseqüente formação de um carbocátion e posterior alquilação de uma dupla ligação. O catião macrocíclico do tipo cembrano originado desta forma é muito reactivo, podendo ser estabilizado pela eliminação de um protão – cembrenos - ou por substituição nucleofílica intramolecular - tiglanos, dafnanos, ingenanos (Bruneton, 1993; Dey

et al, 1991). A biossíntese de diterpenos macrocíclicos e policíclicos encontra-se esquematizada na Figura 1.5 (Bruneton, 1993; Mann, 1992; Dey *et al*, 1991; Dewick, 2002; Evans, 1983).

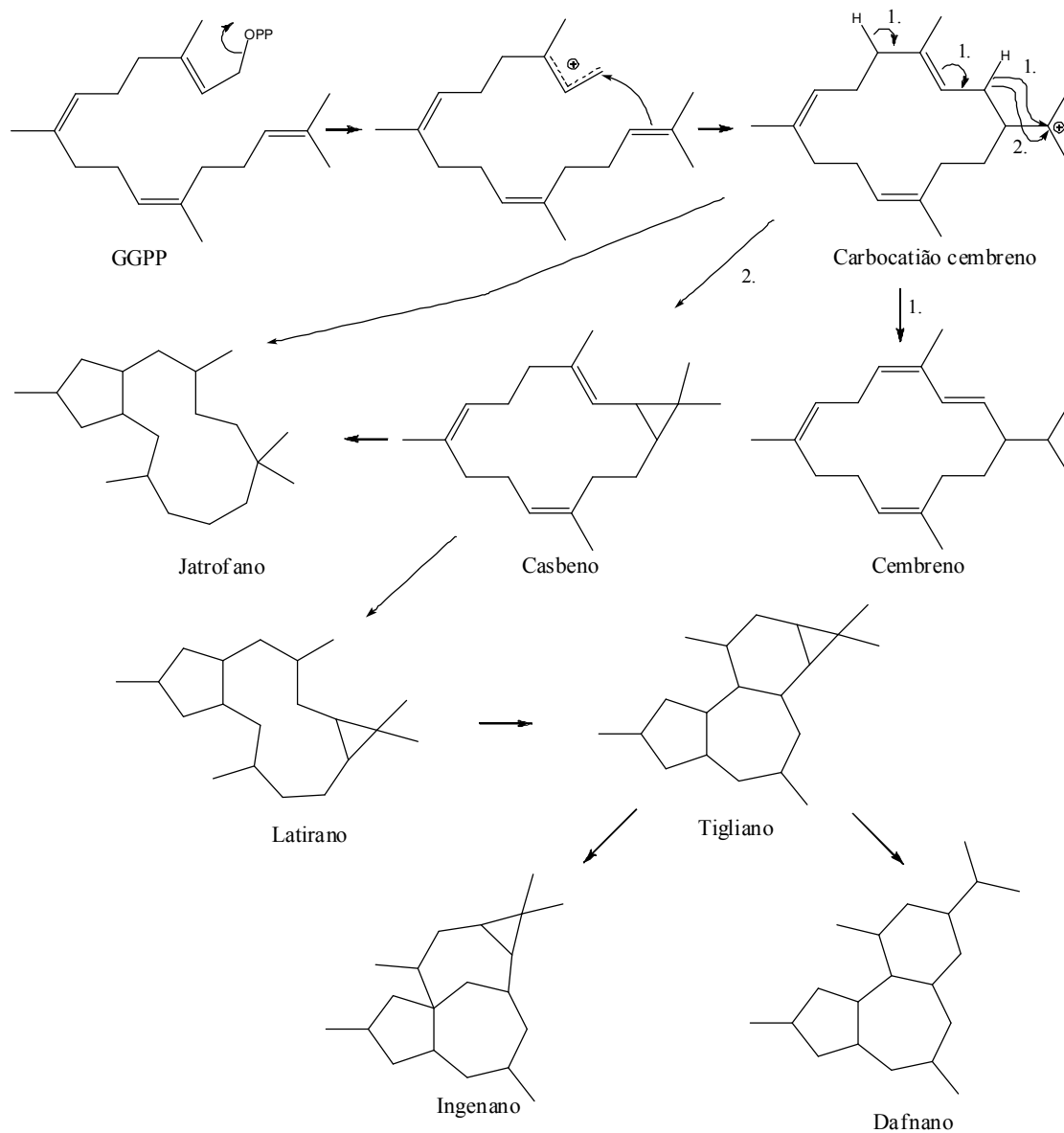


Figura 1.5 – Biossíntese de diterpenos macrocíclicos e policíclicos.

O principal modo de ciclização do GGPP inicia-se com a protonação da ligação dupla isopropilideno terminal, conduzindo à formação de compostos bicíclicos. Este tipo de ciclização conduz a duas séries enantioméricas, dependendo da configuração dos carbonos 5, 9 e 10: a série dita *normal* se a fusão dos anéis A/B é semelhante à dos esteróides e a série *ent* se a mesma fusão é inversa (cf. Figura 1.6; Bruneton, 1993).

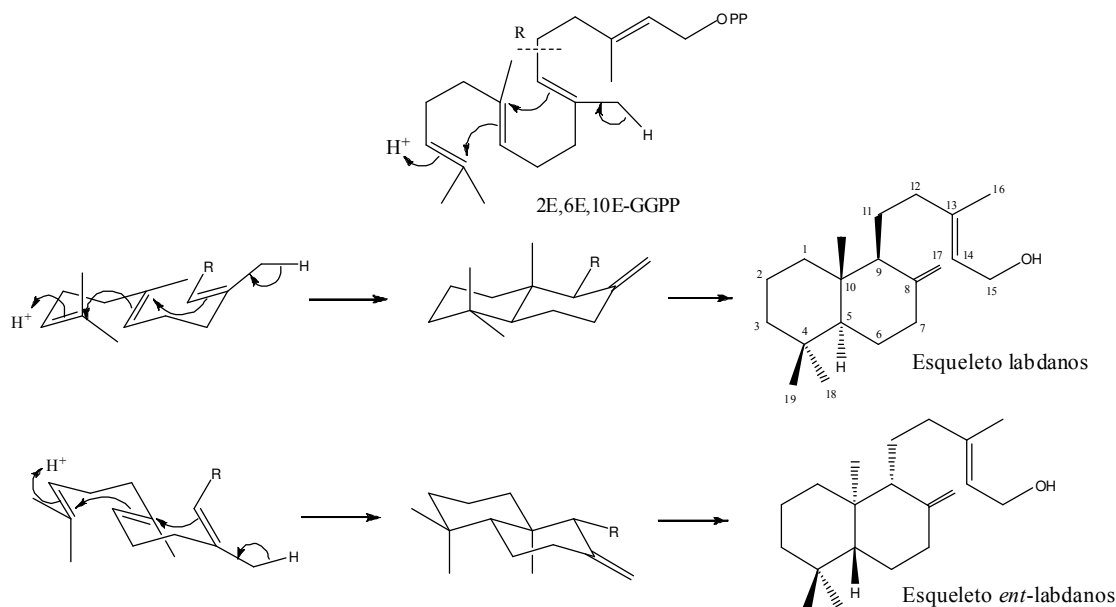


Figura 1.6 – Ciclização do GGPP e formação do esqueleto dos labdanos e dos *ent*-labdanos.

Ciclizações subsequentes decorrentes da saída do grupo pirofosfato e outros rearranjos no esqueleto inicial estão na origem de uma vasta variedade de diterpenos, nomeadamente os clerodanos e a giberelinas (cf. Figura 1.7; Bruneton, 1993; Dey *et al*, 1991).

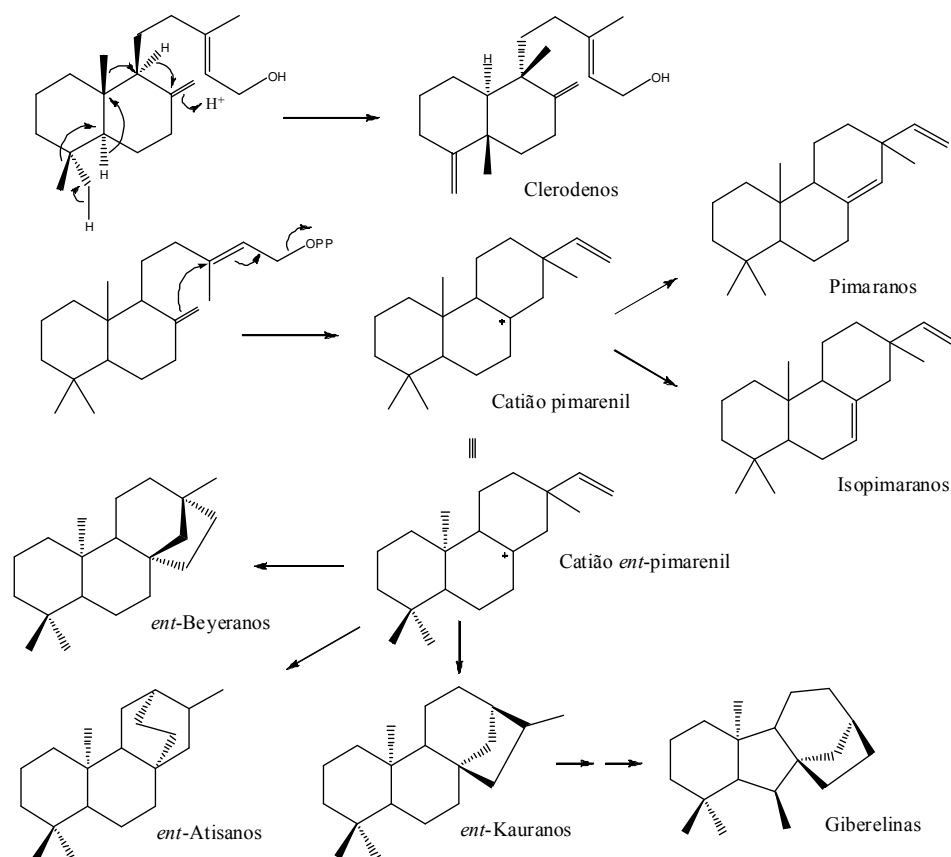


Figura 1.7 – Possibilidades de ciclização e formação de vários esqueletos policíclicos.

1.1.1.2 Triterpenos – Aspectos biogenéticos

Os triterpenos constituem um vasto e diverso grupo de compostos naturais, conhecendo-se mais de 4000 triterpenos, com mais de 40 esqueletos diferentes (Dey *et al*, 1991).

A chave para a elucidação da sua biossíntese consistiu na descoberta de que o seu precursor, o esqualeno, era constituído por duas unidades farnesil, unidas segundo um mecanismo cauda-cauda, ao invés do mecanismo cabeça-cauda típico dos terpenos mais simples (cf. Figura 1.8; Mann, 1994).

O esqualeno é de seguida epoxidado selectivamente na posição 2, formando o 2,3-oxidosqualeno (Mann, 1994). A abertura do epóxido inicia a ciclização. Dependendo da conformação inicial do epoxiesqualeno na superfície da enzima, inicia-se a biossíntese dos curcubitanos e esteróides ou, alternativamente, a dos triterpenos propriamente ditos (cf. Figura 1.9; Bruneton, 1991).

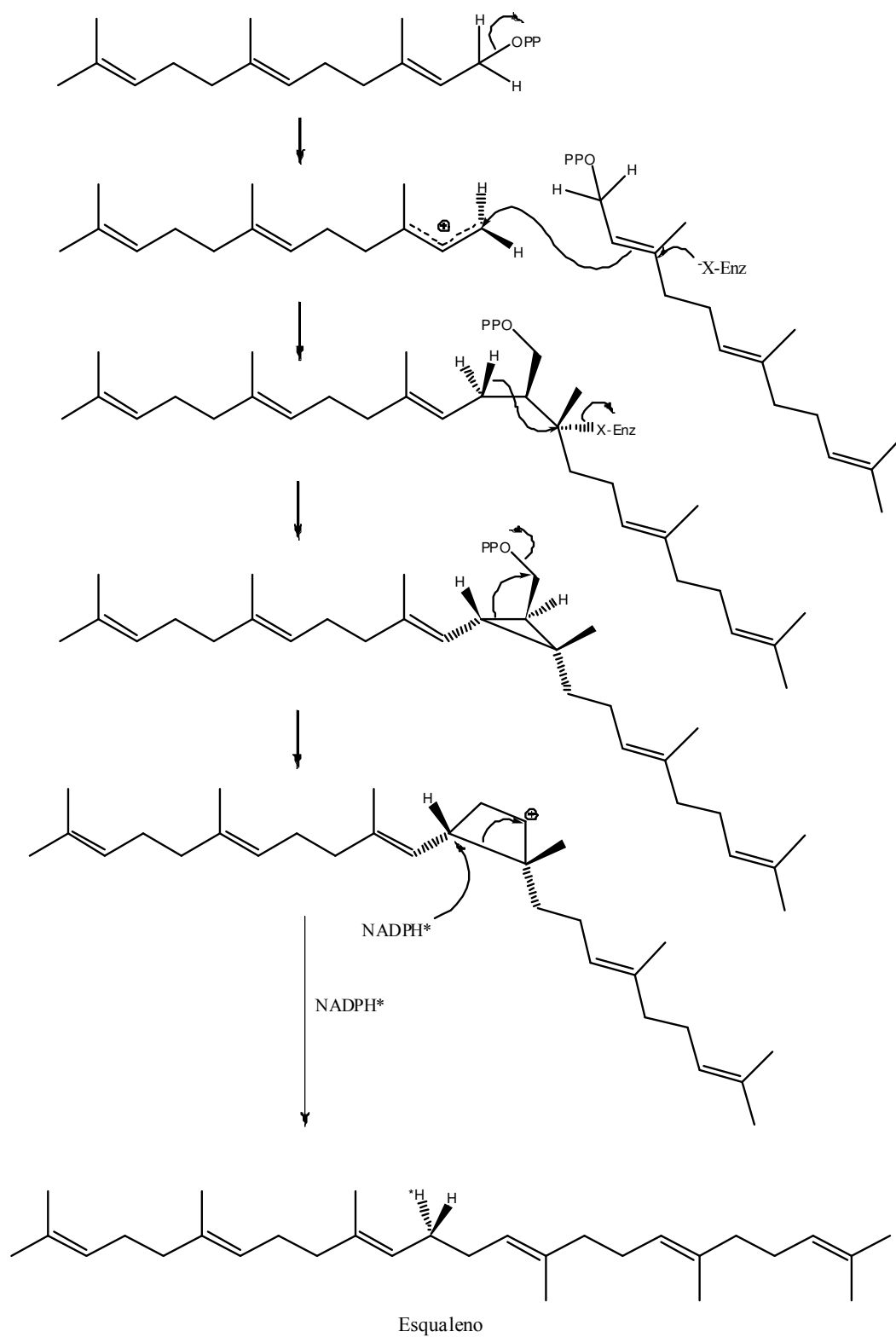


Figura 1.8 – Mecanismo de formação do esqualeno.

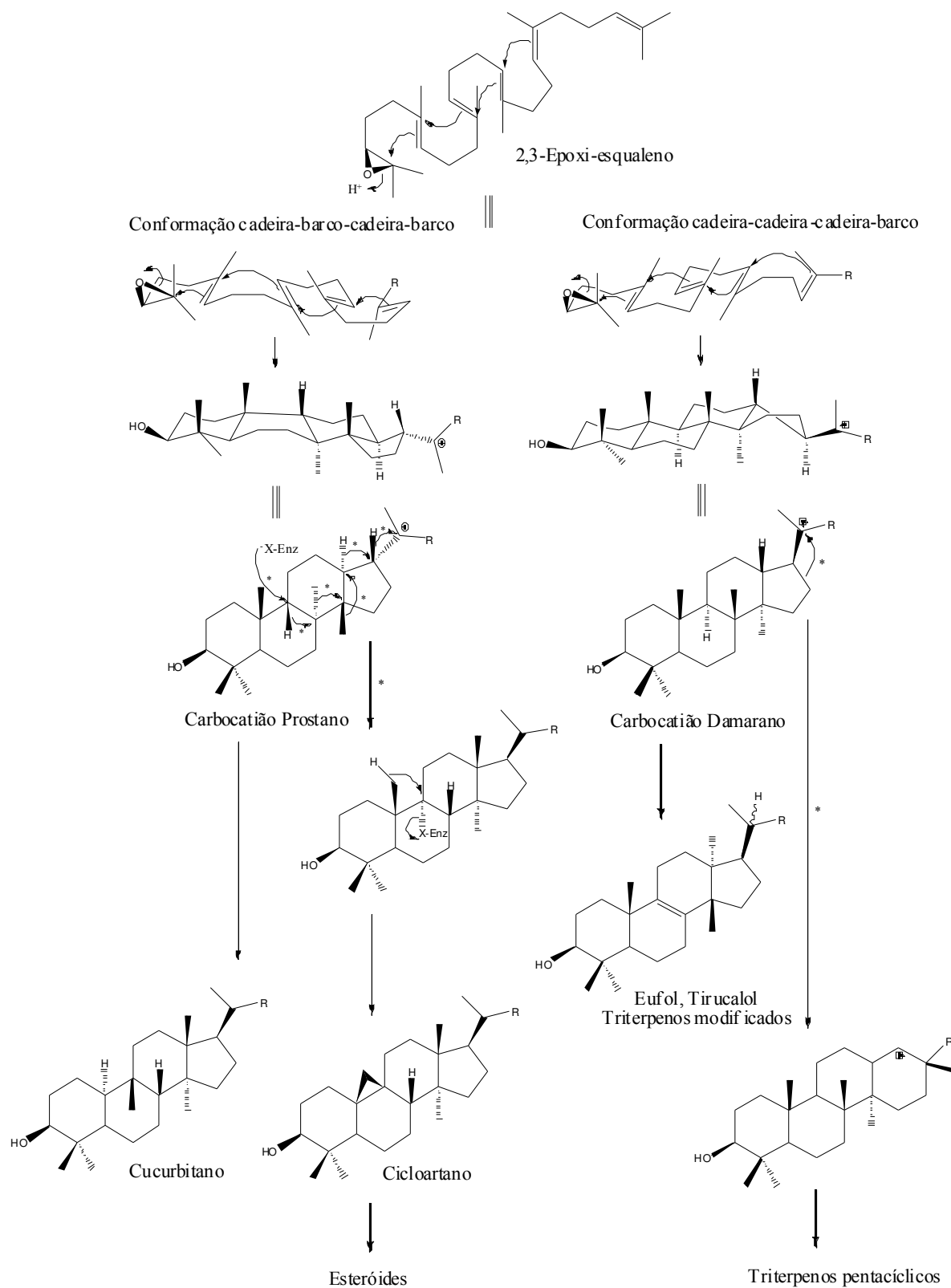


Figura 1.9 – Mecanismos de ciclização do 2,3-epoxi-esqualeno.

1.2 Multirresistência a fármacos anticancerígenos

O tratamento do cancro mediante quimioterapia encontra-se seriamente ameaçado pela multirresistência a fármacos anticancerígenos (em inglês, **M**ultiple **D**rug **R**esistance ou MDR) intrínseca ou adquirida. Efectivamente, cerca de 50% dos cancros humanos são resistentes à quimioterapia ou respondem apenas durante um curto período após o qual deixam de ser afectados pelos fármacos anticancerígenos utilizados comumente (Mulzer *et al*, 2005).

O conceito de multirresistência a fármacos em células cancerígenas foi primariamente introduzido na literatura científica em 1970 (Lage, 2003) e foi mais tarde comprovado por *Shapiro* e *Ling* que observaram que tumores humanos tratados sequencialmente com diferentes quimioterápicos se tornavam resistentes a posterior quimioterapia (Mulzer *et al*, 2005).

A resistência múltipla a fármacos não resulta necessariamente do tratamento das células anticancerígenas com determinado fármaco. Este fenómeno muitas vezes depende do tipo de célula em questão, da sua diferenciação ou localização no organismo. Os tumores cerebrais são um exemplo deste tipo de MDR intrínseca uma vez que estes são resistentes à quimioterapia devido à existência da barreira hemato-encefálica (Stavrovskaya, 2000).

Apesar disso, a resistência múltipla a fármacos é muitas vezes desenvolvida aquando da quimioterapia, sendo consequentemente classificada de MDR adquirida (Stavrovskaya, 2000).

O fenómeno de MDR é multifactorial. Com efeito, em qualquer população de células cancerígenas podem co-existir vários mecanismos de multirresistência a fármacos (Gottesman *et al*, 2002; Teodori *et al*, 2006), sendo esta a principal justificação para a utilização generalizada de terapias combinadas na prática clínica oncológica.

1.2.1 Mecanismos de multirresistência a fármacos anticancerígenos

O fenómeno de MDR em células de mamíferos tem vindo a ser atribuído a um elevado número de mecanismos. Estes mecanismos subdividem-se em não-celulares e celulares (Krishna *et al*, 2000).

1.2.1.1 *Mecanismos de resistência não-celulares*

Os mecanismos de resistência não-celulares são também denominados de “host factors” e como o nome indica, advêm de factores inerentes ao hospedeiro, ao próprio tumor ou ao fármaco anticancerígeno:

(1) *Alterações na ADME* - Uma deficiente absorção ou rápido metabolismo e excreção dos fármacos resulta em reduzidas concentrações séricas destes (Gottesman, 2002);

(2) *Reduzida tolerância a efeitos secundários* - Este fenómeno é particularmente comum em idosos, resultando na necessidade de reduzir as doses abaixo da dose terapêutica eficaz (Gottesman, 2002);

(3) *Insuficiente vascularização das células tumorais* - Este mecanismo traduz-se em três efeitos complementares:

- ✓ inacessibilidade do fármaco às zonas mais interiores do tumor, estando estas células protegidas da sua citotoxicidade (Krishna *et al*, 2000);
- ✓ existência de zonas do tumor hipóxicas e deficientes em nutrientes o que conduz frequentemente ao aparecimento de células viáveis incapazes de sofrer mitose, originando resistência a fármacos cujo mecanismo de acção depende da proliferação celular (Krishna *et al*, 2000);
- ✓ o ambiente ácido que caracteriza os tecidos tumorais, devido à formação de ácido láctico pelas células tumorais hipóxicas, responsável pela resistência a fármacos que consistam em bases fracas pois a sua captação intracelular depende do gradiente de pH ao longo da membrana (Krishna *et al*, 2000);

(4) *Alterações na interação das células tumorais com as células circundantes* – Metabolismo local de fármacos pelas células de tecidos adjacentes ao tumor (Gottesman, 2002);

1.2.1.2 *Mecanismos de resistência celulares*

Estes mecanismos derivam de alterações na bioquímica das células malignas. Estes podem ser ainda classificados como fenótipos clássicos ou típicos de MDR, baseados na distribuição intracelular, e fenótipos não clássicos ou atípicos de MDR, baseados na reacção celular (Krishna *et al*, 2000; Wiese *et al*, 2001).

(1) Fenótipos clássicos de MDR (baseados na distribuição intracelular)

O mais importante e, consequentemente, mais estudado mecanismo de MDR é o derivado de alterações no transporte celular, tanto devido à diminuição do influxo do fármaco como ao aumento do seu efluxo (Krishna *et al*, 2000; Teodori *et al*, 2006). Actualmente, os mais importantes transportadores envolvidos neste mecanismo são a Glicoproteína-P (Pgp) e as proteínas associadas à multirresistência a fármacos (MRP, LRP, BCRP), que pertencem à super-família de ATPases conhecida por ABC (**A**TP-**B**inding **C**assette). A relação filogenética entre estes transportadores encontra-se esquematizada na Figura 1.10.

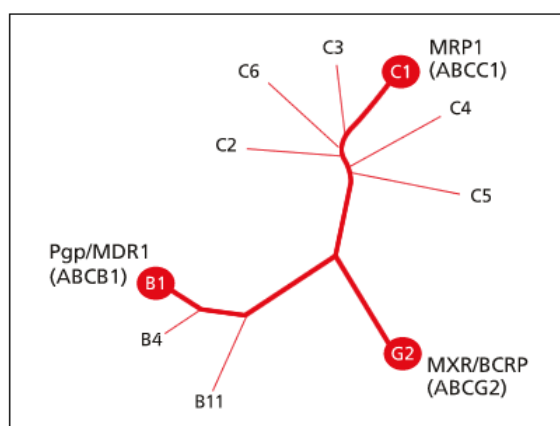


Figura 1.10 – Árvore filogenética dos transportadores ABC envolvidos na multirresistência a fármacos ¹.

Estes transportadores ABC estão envolvidos no fenómeno de MDR ao serem sobreexpressos em células malignas; o efluxo de fármacos anticancerígenos daí decorrente, inviabiliza a sua acumulação intracelular, indispensável para atingir a dose eficaz terapêutica (Gottesman, 2002).

Glicoproteína-P

A P-glicoproteína (Pgp) é uma fosfoglicoproteína com um peso molecular de 170 KDa, com 1280 aminoácidos e é o produto da expressão do gene MDR1 nos humanos (Gottesman, 2002; Gottesman *et al*, 2002; Stavrovskaya, 2000; Wiese *et al*, 2001).

¹

www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Biochemicals/Enzyme_Explorer/Cell_Signaling_Enzymes/Xenobiotics/Drug_Metabolism_Tech_Review.html a 28 de Novembro de 2007.

Esta glicoproteína apresenta duas metades homólogas cada uma com um local de ligação para o ATP, onde ocorre a sua hidrólise, e seis domínios transmembranares (cf. Figura 1.11; Gottesman, 2002; Wiese *et al*, 2001).

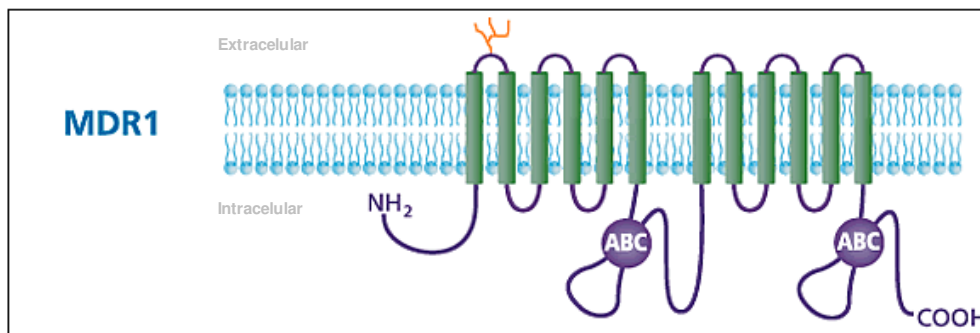


Figura 1.11 – Modelo da topologia membranar da Pgp (MDR 1)².

Nesta figura, as barras verdes representam hélices transmembranares, os círculos roxos representam os locais de ligação do ATP (domínios ABC) e as protuberâncias amarelas representam locais de glicosilação na superfície extracelular.

Efectivamente, ao longo do tempo tem-se vindo a demonstrar que a Pgp bombeia um número elevado de fármacos anti-cancerígenos segundo um mecanismo dependente do ATP e de forma unidireccional (Krishna *et al*, 2000). A P-gp pode ligar-se a um vasto universo de compostos hidrofóbicos neutros ou carregados positivamente tais como antraciclina (doxorubicina, daunorubicina), alcalóides da vinca (vincristina, vinblastina) e taxanos (taxol) bem como fármacos anti-arrítmicos, anti-histamínicos e anti-dislipidémicos como as estatinas (Krishna *et al*, 2000; Gottesman, 2002; Gottesman *et al*, 2002). A sua vasta afinidade para substratos tão diferentes indicia a existência de um ou vários sítios activos grandes e polimórficos nos seus segmentos transmembranares (Gottesman *et al*, 2002).

Existem vários mecanismos propostos para o efluxo destes fármacos levado a cabo pela Pgp. Um dos mecanismos mais populares é o do *aspirador hidrofóbico* (Krishna *et al*, 2000; Gottesman *et al*, 2002; Wiese *et al*, 2001). Este mecanismo encontra-se ilustrado na Figura 1.12.

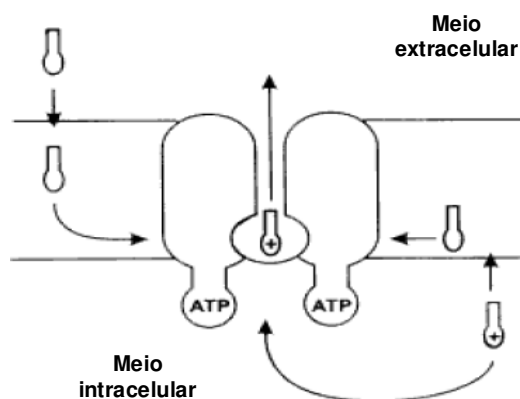


Figura 1.12 – Modelo do *aspirador hidrofóbico* para o funcionamento da Pgp (Wiese *et al*, 2001).

Segundo este, ambas as metades do Pgp formam um canal através do qual o fármaco pode ser expelido do citosol, sob forma carregada, ou directamente da membrana plasmática, sob a forma neutra (Wiese *et al*, 2001). Segundo o modelo da *flipase* (cf. Figura 1.13), proposto por Higgins e Gottesman em 1992, o fármaco penetra na camada fosfolipídica interior da membrana e só depois interage com a Pgp; esta transfere-o da camada fosfolipídica interior constitutiva da membrana celular para a camada fosfolipídica exterior, difundindo-se de seguida para o meio extracelular (Shapiro *et al*, 1995; Wiese *et al*, 2001). Este modelo tem sido criticado na medida em que não explica a difusão do fármaco para o meio extracelular.

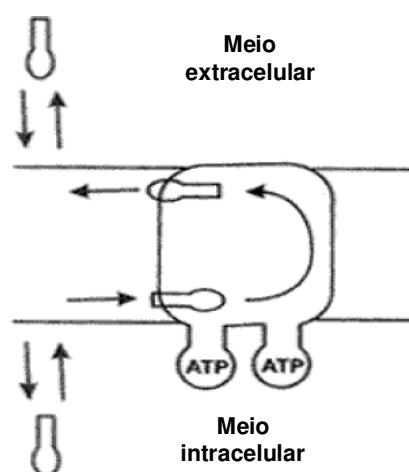


Figura 1.13 – Modelo de *flipase* para o funcionamento da Pgp (Wiese *et al*, 2001).

A Pgp é expressa em tecidos normais tais como o epitélio do fígado, rins, cólon, intestino, pâncreas, placenta, útero e em células endoteliais especializadas do cérebro e testículos.

Enquanto que a Pgp é expressa no cérebro, testículos e placenta (feto) para proteger estas zonas vitais e particularmente sensíveis, de citotoxinas, transportando-as para o lúmen capilar, no fígado, rim e tracto gastrointestinal as citotoxinas são excretadas para a bÍlis, urina e fezes respectivamente, para destoxificação e protecção de todo o organismo (Gottesman, 2002; Gottesman *et al*, 2002; Teodori *et al*, 2006).

Proteínas associadas à Multirresistência a Fármacos (MRP)

Após a descoberta da Pgp e da comprovação da sua sobreexpressão em vários tipos de cancros, descobriu-se que noutros tipos de cancro, nomeadamente cancro dos pulmões, apesar de existir um fenótipo típico de MDR, raramente é devido à existência de Pgp (Gottesman, 2002). Tendo por base este tipo de células tumorais, foi descoberto em 1992 um outro membro da família de transportadores ABC, a proteína associada à multirresistência a fármacos – MRP1 (**M**ultidrug **R**esistance related **P**rotein 1) (Gottesman, 2002; Gottesman *et al*, 2002; Stavrovskaya, 2000). Ao contrário da Pgp que transporta compostos hidrofóbicos, as proterínas MRP transportam moléculas hidrofílicas e mesmo aniões orgânicos. Além destes, também transportam compostos neutros conjugados com a glutathione (GSH), glucoronados ou sulfatados e fármacos anticancerígenos que não formam conjugados com a GSH mas que são co-transportados com a GSH livre (Boumendjel *et al*, 2005).

A MRP1 tem um peso molecular aproximado de 190 KDa e, estruturalmente, é semelhante à Pgp, sendo a única diferença entre as duas a extensão da cadeia proteica no terminal amino de uma das regiões transmembranares, com 5 domínios transmembranares adicionais que correspondem a 280 aminoácidos (cf. Figura 1.14; Stavrovskaya, 2000; Gottesman *et al*, 2002). A MRP1 apresenta um total de 1531 aminoácidos e é codificada pelo gene *mrp1* (Teodori *et al*, 2006).

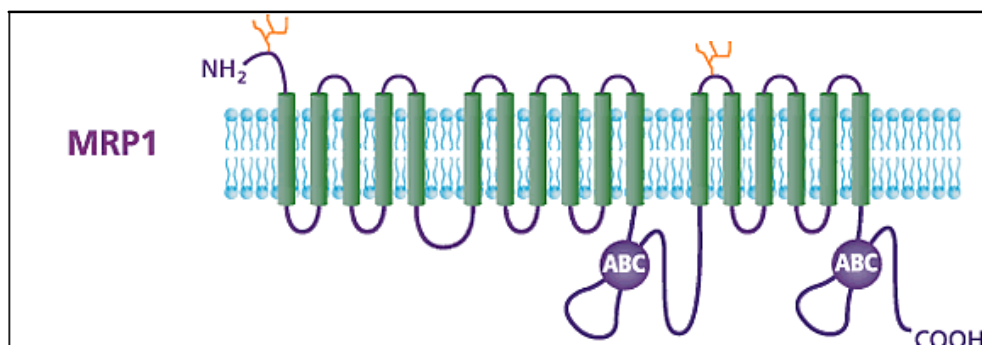


Figura 1.14 – Modelo da topologia membranar da MRP (MRP 1)³.

Nesta figura, as barras verdes representam hélices transmembranares, os círculos roxos representam os locais de ligação do ATP (domínios ABC) e as protuberâncias amarelas representam locais de glicosilação na superfície extracelular.

A MRP1, à semelhança da Pgp, bombeia substâncias tóxicas das células, segundo um mecanismo dependente de ATP, o que se traduz numa deficiente acumulação intracelular do fármaco por parte das células tumorais, conduzindo, inevitavelmente, a resistência (Stavrovskaya, 2000; Krishna *et al*, 2000).

A MRP1 também é expressa em células de hepatócitos, células epiteliais de rins, pâncreas, e de capilares no cérebro e testículos. A sua função fisiológica primordial aparenta ser ao nível da barreira hemato-encefálica, à semelhança da Pgp (Teodori *et al*, 2006). Além disso, nas células normais as proteínas MRP transportam conjugados de glutatona indispensáveis ao normal funcionamento da célula e dos processos inflamatórios (Stavrovskaya, 2000).

A descoberta da proteína MRP1 estimulou a pesquisa no genoma de genes homólogos ao *mrp1*, conduzindo à identificação de novos membros adicionais desta subfamília de transportadores, nomeadamente, MRP2, MRP3, MRP4, MRP5 e MRP6; estudos posteriores confirmaram que também estes transportadores procedem ao transporte de fármacos anticancerígenos e anti-virais (Gottesman, 2002; Gottesman *et al*, 2002). As proteínas MRP7, MRP8 e MRP 9 são descobertas recentes pelo que não foram ainda caracterizadas (Teodori *et al*, 2006).

Existem outros transportadores relacionados com a multirresistência a fármacos anticancerígenos, de menor relevância para o panorama global da MDR, nomeadamente a

BCRP (**B**reast **C**ancer **R**esistance related **P**rotein) e a LRP (**L**ung cancer **R**esistance related **P**rotein).

(2) Fenótipos não-clássicos de MDR (baseados na reacção celular)

Este termo é utilizado para denominar mecanismos de MDR que não dependem do transporte de fármacos através da membrana celular. Este tipo de resistência pode surgir mediante a destoxificação do fármacos devido à acção de glutathione-S-transferases, alterações do alvo nuclear das topoisomerases do DNA; aumento da reparação do DNA e alterações no mecanismo da apoptose (Krishna *et al*, 2000; Wiese *et al*, 2001). Alguns destes mecanismos encontram-se abaixo descritos.

Glutathione (GSH) e seu sistema enzimático associado

Um dos mecanismos de multirresistência a fármacos anticancerígenos envolve o efluxo de fármacos principalmente conjugados com a glutathione (Boumendjel *et al*, 2005). A formação dos conjugados de glutathione é catalizada pela glutathione-S-transferase (GST), estando a sobreexpressão desta enzima associada a fenótipos resistentes (Boumendjel *et al*, 2005). Efectivamente, níveis elevados de GST e GSH são frequentemente observados em tumores resistentes, comparativamente com células normais ou sensíveis. Este é o mecanismo preponderante de resistência a agentes antitumorais alquilantes.

Topoisomerase I e II

As topoisomerases do DNA são os alvos de um vasto número de fármacos anticancerígenos uma vez que se encontram directamente envolvidas na replicação celular (Krishna *et al*, 2000; Wiese *et al*, 2001). As células tornam-se resistentes aos inibidores da topoisomerase II através de vários mecanismos: redução da concentração enzimática de topoisomerase II, mutações no gene que expressa a topoisomerase II e redução dos níveis de mRNA da topoisomerase II, o que se traduz numa redução da citotoxicidade destes fármacos anticancerígenos (Wiese *et al*, 2001; Krishna *et al*, 2000; Bredel *et al*, 2002).

Alteração da regulação da apoptose

Normalmente, os fármacos anticancerígenos actuam por indução da morte celular programada ou apoptose (Krishna *et al*, 2000). A resistência a estes mecanismos desenvolve-se com a perda de genes essenciais à morte celular e por sobreexpressão de genes que bloqueiam este processo de apoptose (Krishna *et al*, 2000; Bredel *et al*, 2002).

1.2.2 *Modulação dos mecanismos de multirresistência a fármacos*

Os fenómenos de MDR são responsáveis pela ineficiência generalizada da quimioterapia do cancro pelo que a sua prevenção conduziria a uma melhoria significativa na resposta terapêutica de um elevado número de pacientes com tumores (Liscovitch *et al*, 2002). As tentativas para o desenvolvimento racional de fármacos que interagissem com as proteínas que medeiam a MDR iniciaram-se imediatamente após a sua identificação (Liscovitch *et al*, 2002). Este esforço mantém-se, estando vários fármacos sob ensaios clínicos avançados mas a lacuna da existência de fármacos de utilidade clínica comprovada e utilização generalizada na terapia do cancro ainda não foi colmatada (Liscovitch *et al*, 2002).

1.2.2.1 *Modulação da MDR mediada pela Pgp*

Especificamente no caso dos mecanismos celulares clássicos (baseados no transporte transmembranar dos fármacos), uma maneira de garantir essa modulação seria através do desenvolvimento de agentes anticancerígenos que não fossem substratos de qualquer tipo de transportador celular. No entanto, a necessidade da sua entrada na célula através da membrana celular para concretização do seu efeito citotóxico e o abrangente padrão de reconhecimento dos transportadores acima referidos, torna esta possibilidade remota. Outra solução seria a utilização de elevadas concentrações do fármaco citotóxico para compensar o seu efluxo das células. No entanto, a esta abordagem estão associados efeitos secundários nefastos evidentes. Consequentemente, a solução que aparenta ser mais viável é o desenvolvimento de inibidores competitivos ou não-competitivos destes transportadores intermembranares. Dependendo do tumor, existem diferenças acentuadas nos substratos e inibidores das proteínas expressas, o que obriga a um diagnóstico prévio dos agentes moduladores mais adequados para a sua remissão.

Apesar dos intensos esforços, não existe ainda um modelo estrutural da Pgp e da MRP, tanto devido à impossibilidade de as isolar nas quantidades e pureza desejáveis como na dificuldade de as cristalizar devido à sua natureza amfipática (Srinivas *et al*, 2006; Teodori *et al*, 2006). Este facto obriga a recorrer a mecanismos indirectos para a determinação da relação entre os aspectos estruturais e a actividade expectável de determinado composto na modulação da MDR (QSAR- **Q**uantitative **S**tructure **A**ctivity **R**elationship)

1.2.2.1.1 QSAR

Os estudos orientados para a elucidação da estrutura molecular dos transportadores ABC – a Pgp e MRP – não têm sido totalmente infrutíferos. De facto, a visualização da Pgp por espectroscopia electrónica, ligada ou não ao substrato e a resolução por cristalografia de raio-X da estrutura de transportadores ABC bacterianos que revelam alguma homologia com a Pgp e a MRP conduziu a um consenso generalizado que aponta para a existência de apenas um domínio de reconhecimento dos substratos. Este domínio deverá ser grande, flexível e polimórfico, podendo acomodar uma vasta variedade de substratos, numa pluralidade de ligações possíveis. Em particular, deverão abundar aminoácidos com anéis aromáticos que, além das interações electrostáticas, são passíveis de estabelecer interações hidrofóbicas (Teodori *et al*, 2006; Higgins, 2007).

À semelhança dos substratos, também os antagonistas dos transportadores ABC apresentam uma vasta variedade estrutural, o que indicia que também estes se deverão ligar ao domínio de reconhecimento referido anteriormente, dependendo as ligações subsequentes da sua estrutura. Sendo assim, facilmente se compreende porque numerosas tentativas de estabelecimento de QSAR abrangentes têm falhado ao longo do tempo. Por outro lado, as QSAR elaboradas num número limitado de compostos, com uma estrutura comparável e em que, consequentemente, é expectável o mesmo tipo de ligação, têm apresentado resultados bastante satisfatórios (Teodori *et al*, 2006).

De qualquer modo, a maioria das QSAR apontam para alguns denominadores em comum para um modulador da Pgp. Estes encontram-se sumarizados em seguida:

Requisitos de lipofilia

A maior parte dos moduladores da Pgp apresenta elevada lipofilia e consiste em bases fracas, parcialmente ionizadas a pH fisiológico (Wiese *et al*, 2001). Wang e os seus colaboradores foram além destas considerações gerais ao propôr um valor óptimo para o Log *P* de um modulador da Pgp: 2,92 (Wang *et al*, 2003a).

Requisitos estéreos

Segundo alguns estudos, o peso molecular de um antagonista da Pgp deverá situar-se entre os 250 e os 2000 (Wiese *et al*, 2001). Além disso, também a distância entre grupos funcionais determinantes (anel aromático e azoto básico) deverá apresentar um comprimento bem

definido de forma a otimizar as interações (Wiese *et al*, 2001). Mais uma vez Wang *et al* concretiza que, em termos estéreos, o valor óptimo para o eixo molecular do composto deverá ser de 18 átomos (Wang *et al*, 2003a).

Capacidade de formação de pontes de Hidrogénio

As pontes de hidrogénio representam um papel chave na maior parte das interações fármaco-receptor e a Pgp não é excepção. Efectivamente, a maioria dos estudos atribui à Pgp o papel de «dadora de protões» para o estabelecimento de pontes de hidrogénio pelo que os seus moduladores deverão consistir em «receptores de protões». Daí advém a justificação para a importância da existência de um azoto terciário na sua estrutura: este, estando desprotonado a pH fisiológico, apresenta um par de elctrões livre para o estabelecimento deste tipo de ligações (Wiese *et al*, 2001).

1.2.2.1.2 Inibição da Glicoproteína-P (Pgp)

As mesmas evidências que comprovam a relação directa que existe entre a expressão da Pgp e a resistência das células tumorais justificam a introdução de inibidores da Pgp na terapêutica de vários tipos de cancro.

Efectivamente, vários fármacos que consistem em substratos da Pgp e que inibem competitivamente a sua função, conseguem induzir em células com fenótipos de MDR a sensibilização a fármacos quimioterápicos, *in vitro* (Sikic *et al*, 1997). Além disso, a terapia combinada de agentes citotóxicos com inibidores deste tipo de MDR resulta numa remissão dos tumores e aumenta a esperança de vida nalguns modelos animais: o citotóxico promove a sua acção de modo eficaz ao permitir atingir uma acumulação intracelular suficiente, apenas possível devido à diminuição da acção da Pgp promovida pelo seu inibidor (Sikic *et al*, 1997).

Foram identificados vários compostos moduladores da Pgp, com estruturas tão diversas como os fármacos por eles transportados (cf. Figura 1.15). A primeira geração destes compostos inclui fármacos já com aplicação clínica nas mais diversas patologias: bloqueadores dos canais de cálcio (verapamil, felodipina, nifedipina e diltiazem), anti-maláricos (quinina), inibidores da calmodulina (trifluoroperazina, clorpromazina e proclorperazina), antibióticos (eritromicinas, cefalosporinas, gramicidinas e puromicinas), agentes imunossupressores (ciclosporina A), fenotiazinas psicotrópicas e alcalóides indólicos (flufenazina e reserpina), hormonas esteróides e não-esteróides (progesterona e tamoxifeno, repectivamente) e muitos outros compostos

lipofílicos (Krishna *et al*, 2000; Liscovitch *et al*, 2002; Stavrovskaya, 2000; Wiese *et al*, 2001). Todos estes compostos são eficazes em concentrações da ordem dos μM (Krishna *et al*, 2000).

A segunda geração de moduladores da MDR mediada pela Pgp inclui derivados dos moduladores de primeira geração mas que apresentam maior potência e selectividade para a MDR, reduzindo, deste modo, os efeitos secundários nefastos tais como cardiotoxicidade, nefrotoxicidade e imunossupressão (Wiese *et al*, 2001; Krishna *et al*, 2000; Liscovitch *et al*, 2002). Com efeito, estes moduladores de segunda geração foram desenvolvidos de modo a eliminar a sua acção farmacológica no alvo original, não relacionada com a resistência a fármacos, mas mantendo ou aumentando o seu efeito modulador: o enantiómero R do Verapamil, por exemplo, consiste num bloqueador de canais de cálcio bastante mais fraco que o isómero S mas apresenta uma eficácia superior no bloqueio da Pgp (Liscovitch *et al*, 2002). Também as concentrações eficazes para esta geração de moduladores ronda os μM mas o seu valor numérico é significativamente mais baixo quando comparados com os de primeira geração: entre 0,5 e 2 μM (Krishna *et al*, 2000).

Por sua vez, à terceira geração pertencem moléculas racionalmente desenvolvidas para interagir com a Pgp, recorrendo a conceitos de relação estrutura-actividade e à química combinatorial (Krishna *et al*, 2000; Liscovitch *et al*, 2002; Stavrovskaya, 2000). Estes agentes são eficazes a concentrações da ordem dos nanomolar (20-100 nM), pelo que facilmente se atingem as doses terapêuticas *in vivo* (Krishna *et al*, 2000; Wiese *et al*, 2001). Na Figura 1.15 apresentam-se alguns exemplos destes compostos e respectiva geração (Krishna *et al*, 2000; Stavrovskaya, 2000; Liscovitch *et al*, 2002; Gottesman, 2002; Wiese *et al*, 2001).

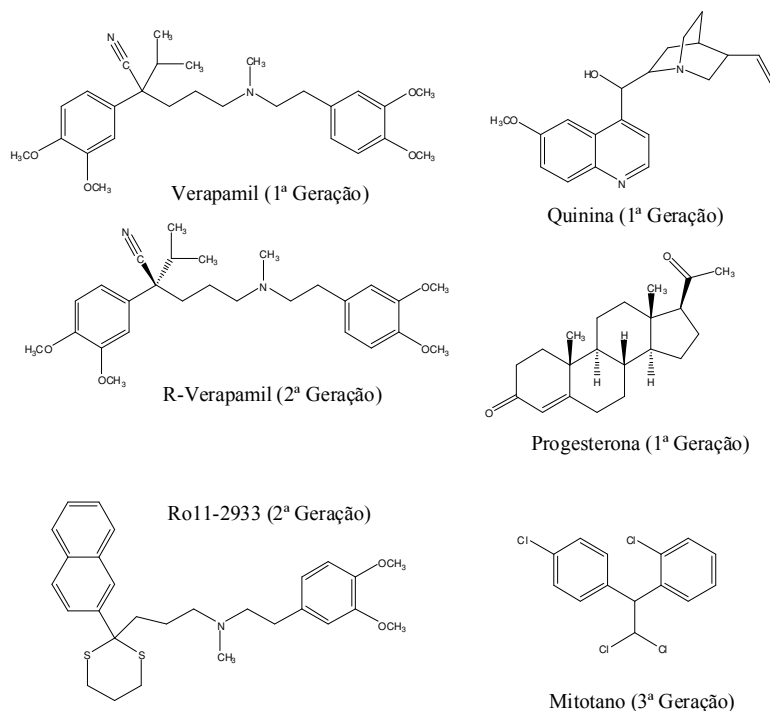


Figura 1.15 – Fármacos moduladores da MDR mediada pela Pgp.

1.2.2.2 Modulação da MDR mediada pela Pgp e pela MRP

A constatação de que a determinado fenómeno de MDR podem estar associados vários mecanismos conduziu ao desenvolvimento e síntese de moduladores biespecíficos, ou seja, que bloqueiam tanto a Pgp como a MRP. Surgiram, deste modo, compostos como o VX-710, o MS-209 e o XR-9576 (Krishna *et al*, 2000; Liscovitch *et al*, 2002). Efectivamente, estes compostos revelaram uma elevada eficácia aliada a segurança, encontrando-se actualmente num avançado estado de desenvolvimento clínico (Teodori *et al*, 2006; Ozben, 2006).

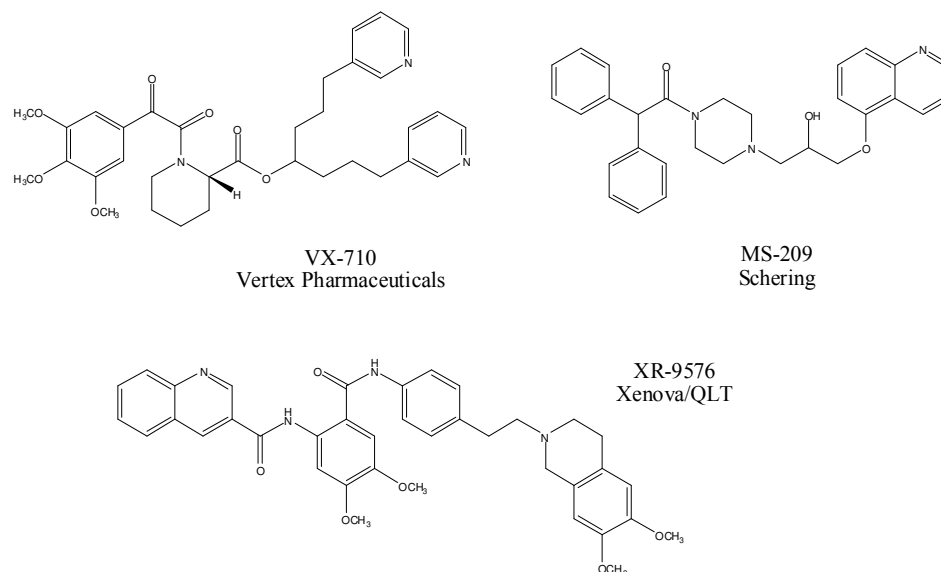


Figura 1.16 – Fármacos moduladores da MDR por inibição cumulativa da Pgp e MRP.

O VX-710 (Biricodar da Vertex Pharmaceuticals, Inc.) encontra-se actualmente em ensaios clínicos de fase II, nos quais tem vindo a demonstrar uma boa segurança e tolerância (Teodori *et al*, 2006). Este consiste num inibidor potente da Pgp e MRP (Ozben, 2006). No entanto, um estudo clínico recente em cancro da próstata revelou resultados algo desanimadores (Teodori *et al*, 2006).

O MS-209 (Dofequidar da Schering AG) é um derivado da quinolona, que modula a MDR *in vitro* e *in vivo*; actualmente encontra-se em ensaios clínicos de fase II para o cancro da mama, (Teodori *et al*, 2006). Em ambas as situações em que é utilizado: tumores sólidos avançados no cancro da mama e dos pulmões, é administrado concomitantemente com o fármaco anticancerígeno Docetaxel (Liscovitch *et al*, 2002; Ozben, 2006).

Um dos mais promissores moduladores da MDR de terceira geração é o XR-9576 (Tariquidar do grupo Xenova), sendo considerado um modulador extremamente potente, selectivo e eficaz, que não interfere com a farmacocinética do paclitaxel e com uma longa duração de acção (Teodori *et al*, 20006; Ozben, 2006). Este já terminou com sucesso os ensaios clínicos de fase II no tratamento de cancro do ovário, em associação com o paclitaxel e vinorelbina (Liscovitch *et al*, 2002) e encontra-se actualmente em ensaios clínicos de fase III tendo sido estes, no entanto, suspensos até se investigarem alguns pormenores relativos às fases I e II (Teodori *et al*, 2006).

1.2.3 *Obstáculos ao desenvolvimento da modulação dos mecanismos de multirresistência*

A especulação que cedo rodeou os compostos moduladores da MDR foi sendo lentamente refreada pelos obstáculos que têm vindo a surgir. Efectivamente, mesmo após 20 anos do aparecimento dos primeiros moduladores da MDR, a descoberta de um fármaco potente, seguro e específico, de utilização generalizada na prática oncológica está longe de ser concretizável.

Em relação à modulação dos fenótipos clássicos de MDR, associados ao transporte celular, as principais dificuldades advêm do desconhecimento da estrutura destes transportadores (Teodori *et al*, 2006).

Outro sério obstáculo prende-se com o facto anteriormente discutido da existência de transportadores como a Pgp e a MRP em vários tecidos humanos não tumorais, nomeadamente na medula óssea e na barreira hemato-encefálica. Influenciar o funcionamento normal destes transportadores pode conduzir a perturbações nas funções fisiológicas fundamentais e a elevados níveis de toxicidade de xenobióticos, poluentes ambientais e mesmo de fármacos quimioterápicos nas células estaminais hematopoiéticas da medula óssea ou noutro tipo de células saudáveis (Gottesman *et al*, 2002). Do mesmo modo, a importância da função destes transportadores nas barreiras fisiológicas (barreira hemato-encefálica), permite antever que o seu compromisso conduza a níveis de toxicidade cerebral intoleráveis (Teodori *et al*, 2002).

Outro motivo de preocupação é a influência da modulação dos fenómenos de multirresistência na farmacocinética e, conseqüentemente, na eficiência e toxicidade de outros fármacos, nomeadamente do próprio quimioterápico administrado concomitantemente (Teodori *et al*, 2002; Teodori *et al*, 2006). Felizmente, fármacos moduladores da MDR descobertos recentemente revelaram elevada potência associada a um aumento de especificidade e diminuição de interações farmacocinéticas relevantes, tais como o R101933, LY335979 e GF120918 (cf. Figura 1.17). Estes compostos pertencem à classe de moduladores da Pgp de 3ª Geração e encontram-se em fase avançada de desenvolvimento clínico (Teodori *et al*, 2002; Teodori *et al*, 2006).

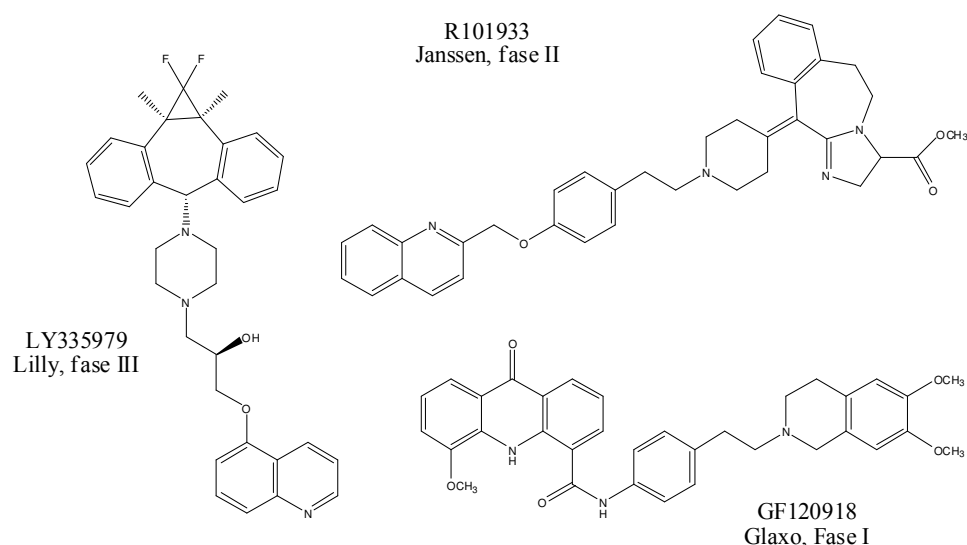


Figura 1.17 – Fármacos moduladores da MDR com reduzidas interações farmacocinéticas.

Por último, mas talvez o mais importante e significativo de todos os obstáculos é a constatação do fenómeno da MDR como um fenómeno complexo e multi-factorial (Teodori *et al*, 2006).

1.2.4 Diterpenos com actividade moduladora da MDR

Apesar dos terpenos carecerem de uma propriedade considerada crítica para a modulação da MDR (um azoto básico), vários elementos desta família apresentam uma actividade significativa nesta área terapêutica (Teodori *et al*, 2002). Efectivamente, vários têm sido os diterpenos isolados de plantas do género *Euphorbia* que apresentaram uma considerável acção moduladora da MDR, modulando predominantemente a acção da Pgp (Appendino *et al*, 2003; Corea *et al*, 2003a; Corea *et al*, 2003b; Corea *et al*, 2004; Duarte *et al*, 2006; Duarte *et al*, 2007; Hohmann *et al*, 2001; Hohmann *et al*, 2002; Madureira *et al*, 2004a; Madureira *et al*, 2006; Valente *et al*, 2004). Na Figura 1.18 encontram-se alguns exemplos de diterpenos com actividade anti-MDR.

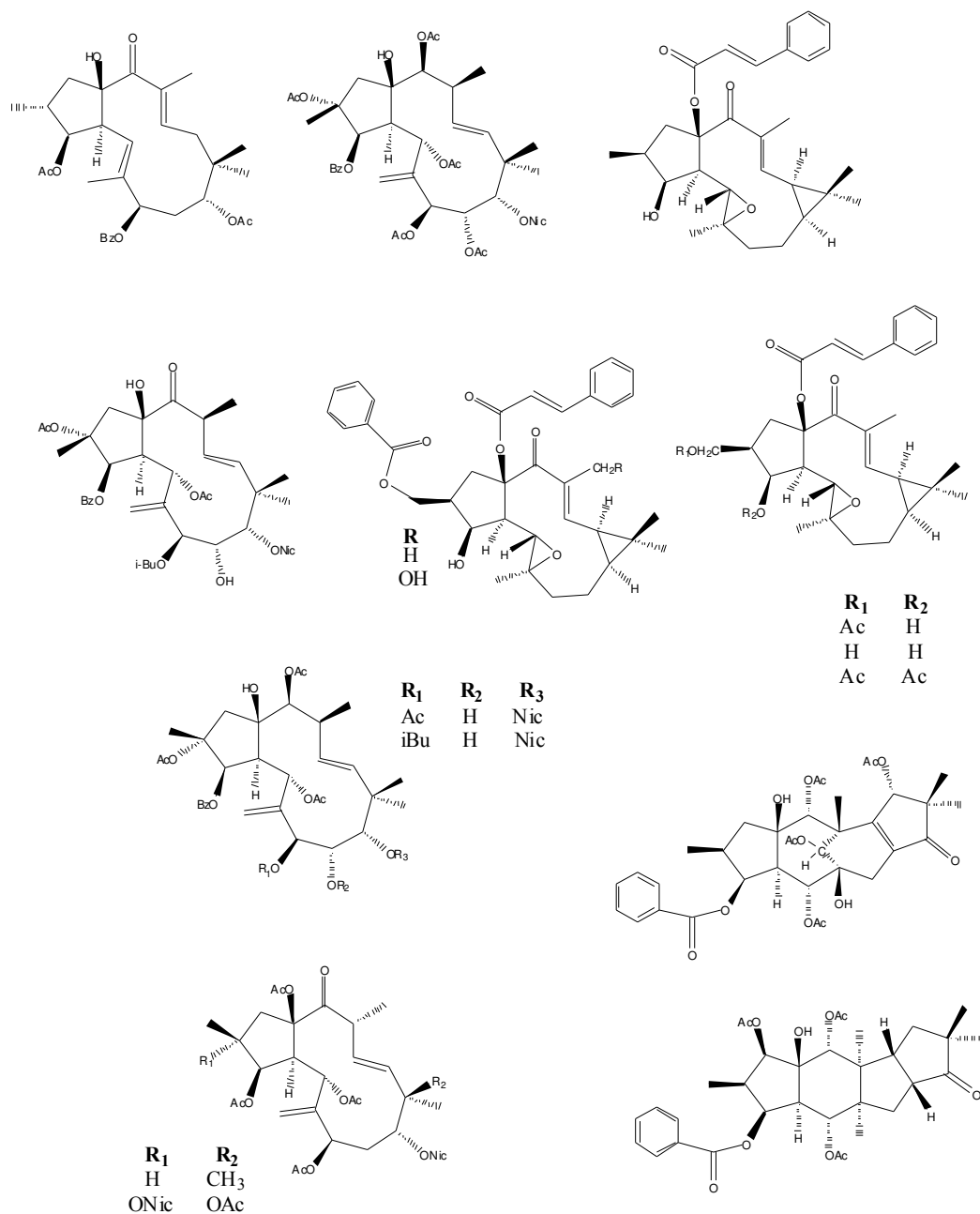


Figura 1.18 – Exemplos de diterpenos com actividade anti-MDR isolados de espécies do género *Euphorbia*.

A análise da Figura 1.18 evidencia a preponderância do esqueleto do jatrofano nos moduladores da MDR, sob forma clássica ou rearranjos. O isolamento moroso e em reduzidas quantidades destes compostos aliados a esta importante aplicação terapêutica tem conduzido várias investigações no sentido de desenvolverem mecanismos para a síntese química laboratorial total deste tipo de esqueletos (Mulzer *et al*, 2005).

1.2.5 *Triterpenos com actividade moduladora da MDR*

A aplicabilidade terapêutica dos triterpenos devido ao seu potencial anticancerígeno e modulador da MDR tem vindo, ao longo do tempo, a ganhar importância. Efectivamente, vários são os triterpenos com actividade moduladora da MDR comprovada, mediante os mais variados mecanismos: inibição da Pgp (ginsenosídeo Rg₃; cicloartano-3 β ,24,25-triol; cicloart-23-eno-3 β ,25-diol), inibição da Pgp complementada pela indução da apoptose (amooranina), indução da apoptose (ácido pomólico), inibição da MRP1 (ácido oleanólico), inibição da BCRP (PPD) ou segundo mecanismos ainda por definir (Kim *et al*, 2003; Madureira *et al*, 2004b; Ramachandran *et al*, 2003; Rabi *et al*, 2003; Fernandes *et al*, 2005; Fernandes *et al*, 2007; Braga *et al*, 2007; Jin *et al*, 2006).

A Figura 1.19 apresenta alguns exemplos de triterpenos com actividade moduladora da MDR (Kim *et al*, 2003; Madureira *et al*, 2004b; Ramachandran *et al*, 2003; Rabi *et al*, 2003; Fernandes *et al*, 2003; Fernandes *et al*, 2005; Fernandes *et al*, 2007; Braga *et al*, 2007; Jin *et al*, 2006; Kashiwada *et al*, 1998; Kashiwada *et al*, 2007; Urban *et al*, 2007).

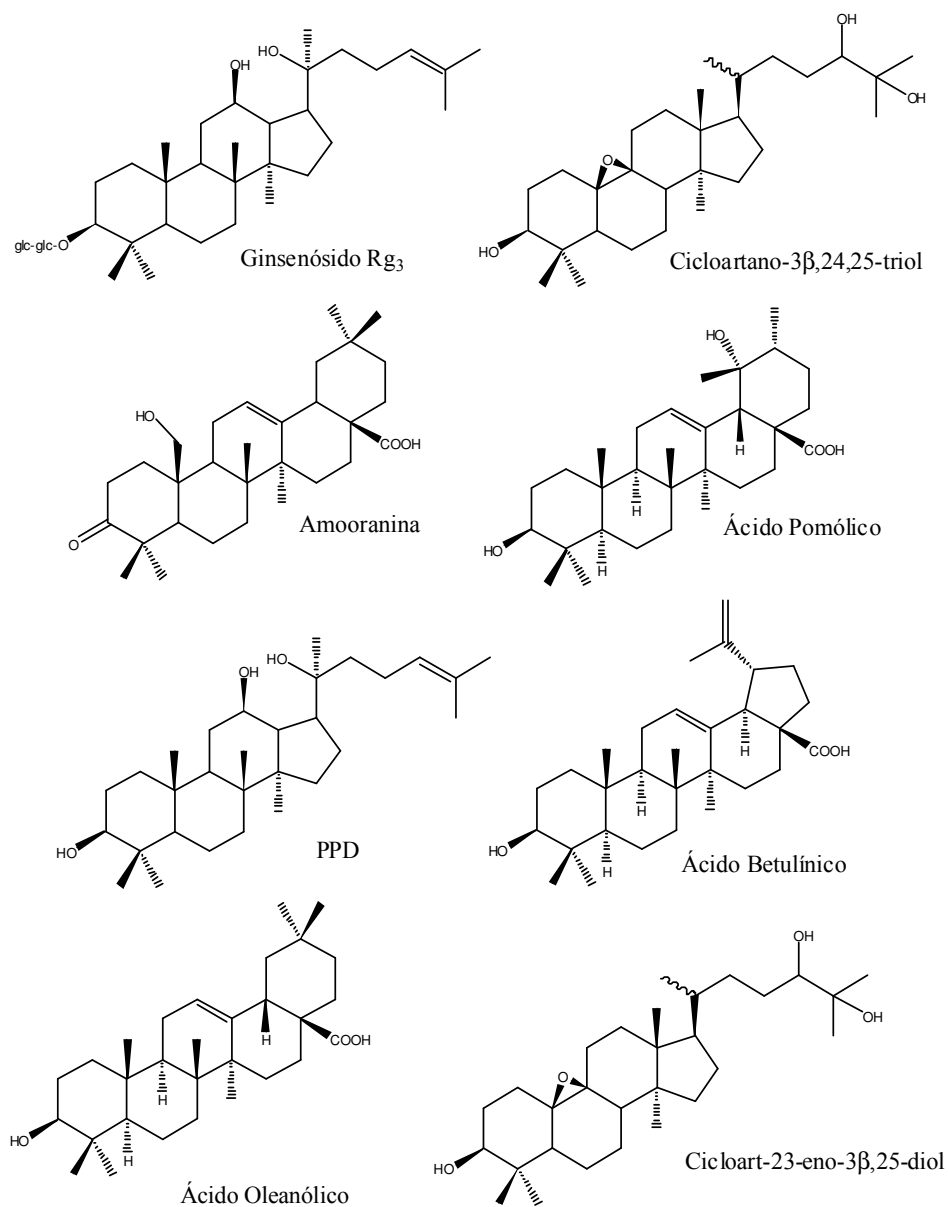


Figura 1.19 – Exemplos de triterpenos com actividade moduladora da MDR.

2 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A espécie *Euphorbia mellifera* Ait., particularmente abundante na Madeira, é endémica da flora da Macaronésia, apresentando-se sob forma de um arbusto perene ou pequenas árvores (cf. Figura 2.1). Cresce essencialmente em locais húmidos, pouco expostos à luz solar, em ravinas entre os 400 e os 1100 m. Esta espécie existe também noutros arquipélagos que integram a Macaronésia, nomeadamente o das Canárias (Press *et al*, 1994).



Figura 2.1 – Exemplar da espécie *Euphorbia mellifera* Ait. (adaptado de www.dq.fct.unl.pt/goa/research.html).

Existe um estudo fitoquímico prévio da espécie *Euphorbia mellifera* Ait. vocacionado maioritariamente para a obtenção de compostos triterpénicos (Ferreira, 1990; Ferreira *et al*, 1990; Ferreira *et al*, 1991). Este estudo conduziu à descoberta de uma nova classe de triterpenos pentacíclicos, representada por quatro compostos novos (madeiranol, madeiranona, isomadeiranol e isomadeiranona), ao isolamento de dois novos álcoois triterpénicos com o esqueleto *abeo*-tirucalano (meliferol e euférol) e a outros compostos já conhecidos como a taraxerona, o lanosterol, a moretenona, o butirospermol, o cicloartenol, o 24-metilenocicloartanol e o β -Sitosterol (esteróide) (cf. Figura 2.2).

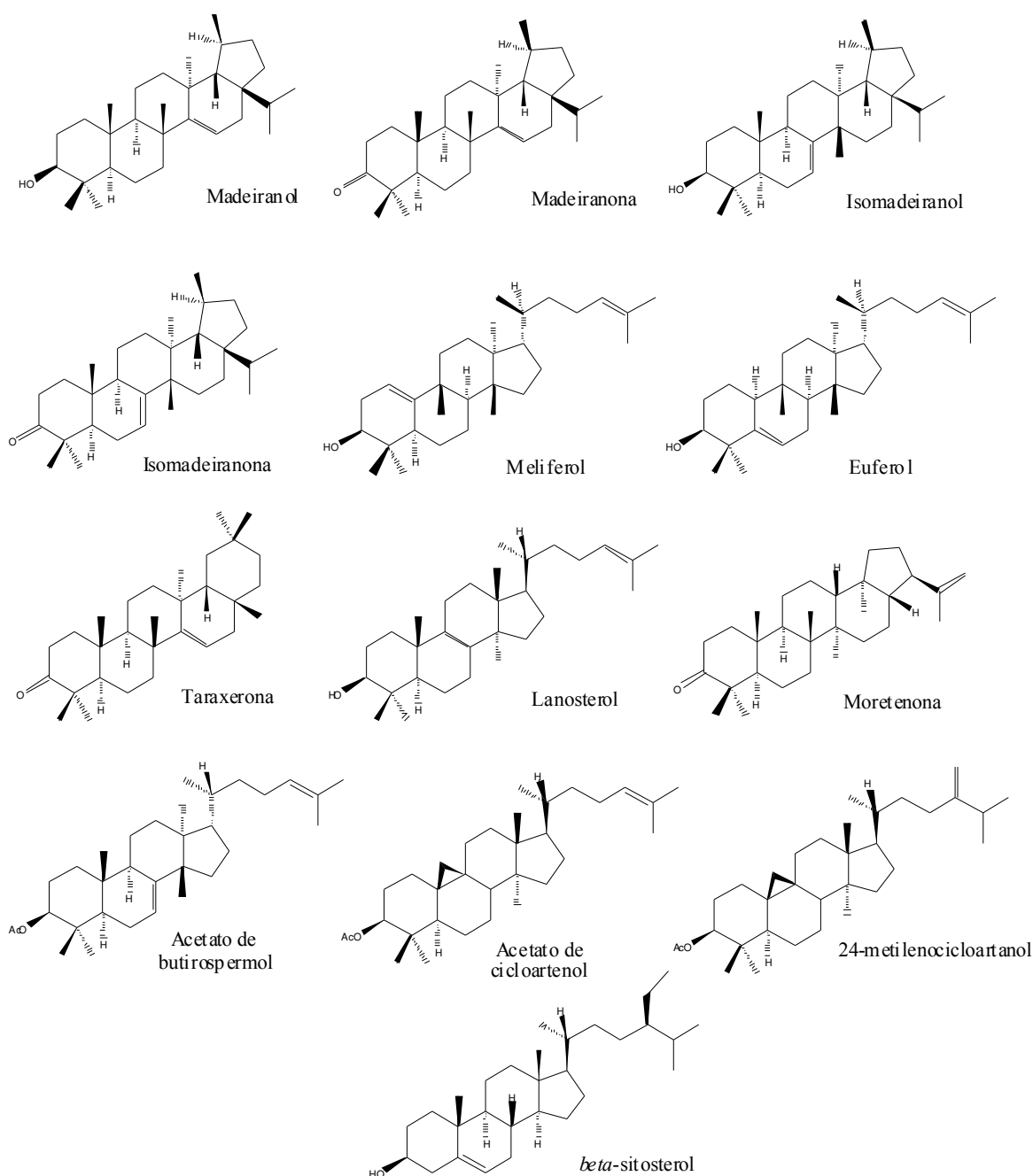


Figura 2.2 – Compostos triterpénicos e esteróides previamente isolados de *Euphorbia mellifera* Ait.

O facto do estudo fitoquímico referido ter sido apenas direccionado para o isolamento de triterpenos conduziu a um novo estudo focalizado nos diterpenos aquando desta dissertação, tendo-se isolado a partir do extracto metanólico de um dos seus espécimes: cinco diterpenos com o esqueleto do jatrofano (três dos quais novos), um diterpeno com o esqueleto do ingenano, quatro triterpenos tetracíclicos (um dos quais novo) e um composto fenólico. A espécie *Euphorbia mellifera* Ait. sob análise é proveniente do Jardim Garcia da Horta, tendo sido a sua identificação levada a cabo pela Dra. Teresa Vasconcelos do Instituto Superior de Agronomia.

Os diterpenos isolados foram sujeitos a estudos para a avaliação da sua capacidade de modulação da multirresistência a fármacos anticancerígenos e da sua actividade anti-proliferativa. Estes estudos foram elaborados em colaboração com o Professor Joseph Molnár da Universidade de Szeged na Hungria (Departamento de Microbiologia e Imunobiologia Médica).

2.1 Estudo fitoquímico

2.1.1 Diterpenos com o esqueleto do jatrofano

2.1.1.1 Eufomeliferina (7 β ,8 β ,9 α -triacetoxi-3 β -benzoiloxi-15 β -hidroxi-14-oxo-2 β H,13 α H-jatrofa-5E,11E-dieno)

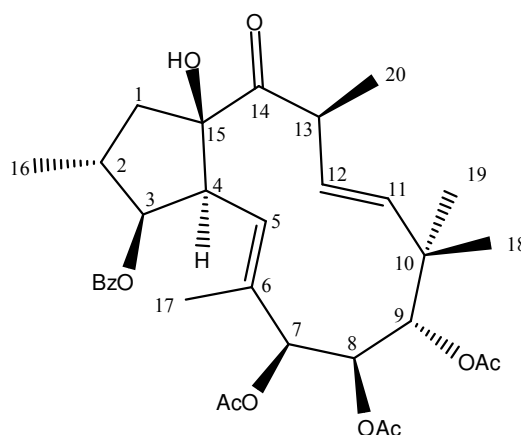


Figura 2.3 – Estrutura da eufomeliferina (1).

À eufomeliferina (1) foi atribuída a estrutura do 7 β ,8 β ,9 α -triacetoxi-3 β -benzoiloxi-15 β -hidroxi-14-oxo-2 β H,13 α H-jatrofa-5E,11E-dieno. Trata-se de um composto novo, não

isolado anteriormente. A fórmula molecular $C_{32}H_{42}O_{10}$ foi corroborada pelo íão obtido a m/z 609 $[M+Na]^+$ no espectro de ESI-MS correspondente.

O espectro de infravermelho apresentou uma banda de absorção larga e intensa, típica de grupos hidroxilo, a 3532 cm^{-1} , e de uma banda a 716 cm^{-1} característica do anel aromático. Este espectro evidenciou ainda a presença de carbonilos, numa banda a 1741 cm^{-1} mais larga que uma banda típica de função carbonilo o que indicou a presença de dois sinais não resolvidos (ésteres e cetona).

A existência de um grupo hidroxilo adiantada pelo espectro de infravermelho foi suportada pela presença de um singlete largo a δ_H 2,84 no espectro de 1H -RMN (cf. Tabela 2.1), sem qualquer correlação no espectro de HMQC. O espectro de 1H -RMN evidenciou a existência de três grupos acetilo e de um anel benzênico (cf. Tabela 2.1). Este espectro evidenciou, além dos grupos acilo, a existência de três grupos metilo ligados a carbonos totalmente substituídos, sendo um deles olefínico (δ_H 1,77, 1,05 e 0,90), de dois metilos secundários (dupletos a δ_H 1,40 e 1,29) e de três prótons olefínicos a δ_H 5,40 (d , $J = 16,0\text{ Hz}$), 6,02 (dd , $J = 8,0$ e $16,0\text{ Hz}$) e a 5,78 (d , $J = 12,0\text{ Hz}$). O valor elevado da constante de acoplamento ($J = 16,0\text{ Hz}$) observado para os sinais a δ_H 5,40 e 6,02 revelou a presença de uma ligação dupla *trans* (*E*) endocíclica.

Excluindo os grupos acilo, estabeleceu-se a fórmula molecular $C_{20}H_{32}O_6$ para o álcool diterpénico, a qual corresponde a cinco graus de insaturação. Considerando a presença de duas ligações duplas e de um grupo carbonilo, deduziu-se a estrutura bicíclica do composto.

Tabela 2.1 – Espectros de ^1H e ^{13}C -RMN e correlações observadas nas experiências ^1H - ^1H COSY e HMBC ($\text{C}\rightarrow\text{H}$) da eufomeliferina [400 MHz (^1H), 100,61 MHz (^{13}C), CDCl_3 , δ (ppm) (J em Hz)].

Posição	^1H	^{13}C	DEPT	^1H - ^1H COSY	HMBC ($\text{C}\rightarrow\text{H}$)
1 α	1,71 <i>dd</i> (8,0; 12,0)	49,2	CH_2	1 β , 2	3, 16
1 β	2,29 <i>dd</i> (8,0; 12,0)	49,2	CH_2	1 α , 2	3, 16
2	2,57 <i>m</i>	40,7	CH	3, 16	1, 16
3	5,01 <i>dd</i> (4,0; 8,0)	84,3	CH	2, 4	1, 2, 16
4	3,66 <i>dd</i> (8,0; 12,0)	49,2	CH	3, 5	1, 2, 16
5	5,78 <i>d</i> (12,0)	117,7	CH	4, 17	4, 7, 17
6	-	136,4	-	-	4, 7, 8, 17
7	4,94 <i>s</i>	78,4	CH	-	5, 8, 9, 17, 7-OAc
8	4,83 <i>s</i>	69,2	CH	-	7, 17, 8-OAc
9	5,33 <i>s</i>	73,0	CH	-	7, 11, 18, 19, 9-OAc
10	-	39,4	-	-	8, 9, 11, 12, 18, 19
11	5,40 <i>d</i> (16,0)	138,6	CH	12	9, 13, 18, 19
12	6,02 <i>dd</i> (8,0; 16,0)	131,5	CH	11, 13	13, 20
13	3,20 <i>m</i>	53,0	CH	12, 20	11, 12, 20
14	-	213,6	-	-	-
15	2,84 <i>bs</i>	92,3	-	-	1, 3, 4, 13
16	1,29 <i>d</i> (8,0)	19,4	CH_3	2	1, 2, 3
17	1,77 <i>s</i>	16,1	CH_3	-	5, 7
18	1,05 <i>s</i>	23,9	CH_3	-	9, 11, 19
19	0,90 <i>s</i>	21,5	CH_3	-	9, 11, 18
20	1,40 <i>d</i> (8,0)	16,3	CH_3	13	12, 13
7-OAc	$\text{C}=\text{O}$	-	C	-	7, $\text{C}=\text{O}$ do 7-OAc
	Me	1,46 <i>s</i>	CH_3	-	-
8-OAc	$\text{C}=\text{O}$	-	C	-	8, $\text{C}=\text{O}$ do 8-OAc
	Me	2,10 <i>s</i>	CH_3	-	-
9-OAc	$\text{C}=\text{O}$	-	C	-	9, $\text{C}=\text{O}$ do 9-OAc
	Me	2,13 <i>s</i>	CH_3	-	-
3-Obz	$\text{C}=\text{O}$	-	C	-	3, 2', 6'
	1'	-	C	-	2' - 6'
	2'	8,13 <i>bd</i> (8,0)	CH	-	3', 5'
	3'	7,53 <i>bt</i> (8,0)	CH	-	2', 4', 6'
	4'	7,59 <i>bt</i> (8,0)	CH	-	2', 6'
	5'	7,53 <i>bt</i> (8,0)	CH	-	2', 4', 6'
	6'	8,13 <i>bd</i> (8,0)	CH	-	3', 5'

Os espectros de ^1H - ^1H -COSY e HMQC permitiram estabelecer a estrutura de dois fragmentos de prótons acoplados (cf. Figura 2.4).

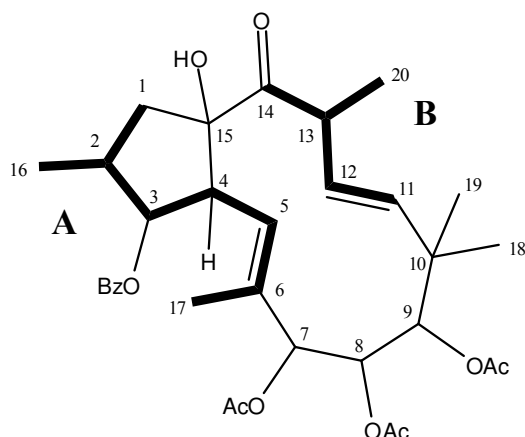


Figura 2.4 – Fragmentos estruturais (A, B), estabelecidos através das experiências de ^1H - ^1H COSY e HMQC, da eufomeliferina.

O carbono a δ_{C} 78,4 foi atribuído a C-7, de acordo com as correlações que apresentou com o grupo metilo Me-17 e com o próton H-5 no espectro de HMBC. Os acoplamentos $^2J_{\text{C-H}}$ C-10/Me-18, C-10/Me-19 e $^3J_{\text{C-H}}$ C-18/Me-19, C-19/Me-18 permitiram estabelecer um grupo *gem*-dimetilo, que foi ligado ao fragmento B, de acordo com as correlações $^3J_{\text{C-H}}$ C-11/Me-18 e C-11/Me-19. Os acoplamentos $^3J_{\text{C-H}}$ entre C-9/Me-18 e C-9/Me-19 conduziram à localização em C-9 do grupo oximetino a δ_{C} 78,4. A correlação $^2J_{\text{C-H}}$ entre C-7/H-8 localizou o oximetino a δ_{C} 69,2 em C-8. Por sua vez, o oximetino a δ_{C} 92,3 foi localizado na posição C-15 mediante as correlações $^2J_{\text{C-H}}$ entre C-15/H-1 e C-15/H-4 e $^3J_{\text{C-H}}$ entre C-15/H-3 e C-15/H-13.

Além de unir os dois fragmentos estabelecidos pelo espectros de COSY e HMQC, o espectro de HMBC permitiu associar os prótons oximetínicos aos grupos acilo geminais, mediante as correlações $^3J_{\text{C-H}}$ observadas entre os carbonos carbonílicos e os oximetinos correspondentes. Além disso, os acoplamentos $^2J_{\text{C-H}}$ entre os carbonos carbonílicos e os grupos metilo dos acetatos também permitiram a sua atribuição.

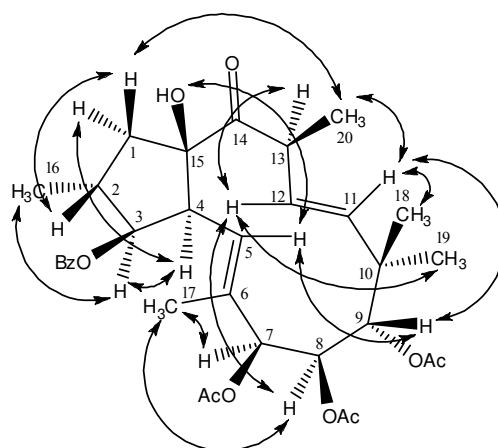
O espectro de NOESY juntamente com as constantes de acoplamento permitiram estabelecer a estereoquímica relativa do composto (cf. Tabela 2.2 e Figura 2.5). Ao próton H-4 foi atribuída uma configuração α , em analogia a todos os outros diterpenóides macrocíclicos isolados do gênero *Euphorbia* (Appendino *et al*, 1998; Günther *et al*, 1998; Hohmann *et al*, 1999). O marcado efeito nuclear de Overhauser entre H-4/H-3, H-4/H-1 α e H-3/Me-16 permitiu estabelecer uma configuração α para o próton H-3 e para o grupo metilo Me-16 e identificar o próton H-1 α (δ_{H} 1,71). Por sua vez, H-1 β (δ_{H} 2,29) apresentou uma forte

correlação com H-2 (δ_H 2,57) permitindo desta forma corroborar a configuração α do metilo em C-16. As correlações H-1 β /Me-20, Me-20/H-12 e H-13/H-11 evidenciaram a configuração β em do grupo metilo Me-20 e suportaram a geometria *trans* da ligação dupla entre C-11 e C-12, corroborada também pela ausência de efeito de NOE entre H-11/H-12. O efeito de NOE entre H-11/Me-19, H-11/H-8, H-12/Me-18 e H-12/H-9 permitiram estabelecer uma orientação β para o protão H-9 e Me-18 e α para o protão H-8 e Me-19, tendo estas conclusões sido reforçadas pelas fortes interações observadas entre H-8/Me-19 e Me-18/H-9. A estereoquímica em C-7 foi deduzida com base no efeito de NOE entre H-8/Me-17 e Me-17/H-7, tendo sido confirmada pela forte interação observada entre o grupo acetilo nesta posição e os protões *orto*-aromáticos do grupo benzoílo em C-3 e pelo seu valor de desvio químico a campo particularmente alto (δ_H 1,46) devido ao efeito anisotrópico do anel aromático. As fortes correlações H-9/H-5, H-5/15-OH e a ausência de efeito de NOE entre H-5 e o grupo Me-17 permitiram a atribuição de geometria *E* à ligação dupla C-5/C-6 e corroboraram a fusão *trans* dos anéis.

Os valores das constantes de acoplamento $J_{2,3}/J_{3,4}$ encontrados para a eufomelifarina ($J_{2,3} = 4,0$ Hz e $J_{3,4} = 8,0$ Hz) vieram confirmar a estereoquímica em C-2 e C-3 na medida em que para a estereoquímica Me-16 β e H-3 α , os valores de $J_{2,3}$ e $J_{3,4}$ são semelhantes ($\approx 3-4$ Hz) (Hohmann *et al*, 1999; Valente *et al*, 2003; Jakupovic *et al*, 1998; Hohmann *et al*, 2002; Appendino *et al*, 1998; Liu *et al*, 2001); por outro lado, a uma estereoquímica Me-16 α e H-3 α encontram-se associadas constantes de acoplamento distintas, aproximadamente, $J_{2,3} \approx 3,5$ Hz e $J_{3,4} \approx 7,0$ Hz (Yamamura *et al*, 1981), valores próximos dos encontrados para a eufomelifarina. A estereoquímica em C-20 foi ainda apoiada pelo valor da constante de acoplamento $J_{13,20}$ descrita para compostos semelhantes (Hohmann *et al*, 2002; Jakupovic *et al*, 1998).

Tabela 2.2 – Principais interações de NOE observadas para a eufomeliferina.

Posição	NOESY
1 α	1 β , 4
1 β	1 α , 2, 20
2	1 β , 16
3	2, 4, 8, 16
4	1 α , 3, 5
5	3, 4, 9, 15
7	17
8	9, 11, 17, 19
9	5, 8, 12, 18
11	8, 13, 19
12	9, 11, 13, 18, 20
13	11, 20
15	5
16	1 α , 2, 3
17	4, 7, 8
18	9, 12
19	8, 11
20	1 β , 12, 13

**Figura 2.5** – Principais efeitos de NOE da eufomeliferina.

2.1.1.2 *Eufomelifereno A* ($7\beta,8\beta,9\alpha,14\beta,15\beta$ -pentacetoxi- 3β -benzoiloxi- 2α H, 13α H-jatrofa- $5E,11E$ -dieno)

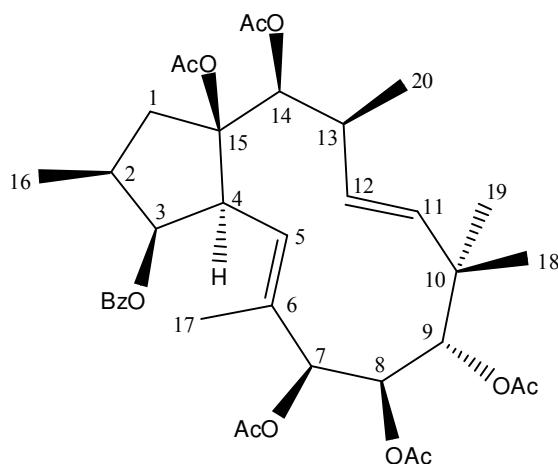


Figura 2.6 – Estrutura do eufomelifereno A (2).

Ao composto **2** isolado sob a forma de um pó branco amorfo e designado por eufomelifereno A foi atribuída a estrutura do $7\beta,8\beta,9\alpha,14\beta,15\beta$ -pentacetoxi- 3β -benzoiloxi- 2α H, 13α H-jatrofa- $5E,11E$ -dieno. Encontra-se descrito na literatura um jatrofano que apresenta os mesmos substituintes que o eufomelifereno A mas com configuração inversa no carbono C-2 (Hohmann *et al*, 2003a). No entanto, com esta estereoquímica específica não foi encontrada qualquer referência bibliográfica pelo que se crê consistir num composto novo.

O espectro de massa ESI-MS possibilitou a atribuição da fórmula molecular $C_{37}H_{48}O_{12}$, mediante o aparecimento do ião a m/z 707 $[M+Na]^+$.

O espectro de infravermelho evidenciou a existência de funções éster e de um anel benzénico.

O espectro de 1H -RMN corroborou a existência de um benzoato pelo sistema de sinais típico que apresentou a campo baixo (δ_H 7,97, *d*, $J = 7,2$ Hz; 7,55, *t*, $J = 7,2$ Hz; 7,44, *t*, $J = 7,2$ Hz), de cinco grupos acetato (δ_H 2,33, 2,17, 2,08, 2,06 e 1,14), de cinco protões geminais a função éster (δ_H 5,43, 5,13, 5,03, 5,01 e 4,94) e de três protões olefínicos (δ_H 5,70, 5,67 e 5,11), confirmado pelos espectros de ^{13}C -RMN e DEPT (cf. Tabela 2.3). Além dos sinais correspondentes às funções éster, o espectro de 1H -RMN mostrou ainda sinais correspondentes a cinco grupos metilo, um dos quais olefínico, sob a forma de singletos (δ_H 1,89, 1,00 e 0,87) e de dois dupletos parcialmente sobrepostos (δ_H 0,96, $J = 6,4$ Hz e 0,96, $J =$

6,4 Hz). A geometria *trans* da ligação dupla dissubstituída foi indicada pelo elevado valor das constantes de acoplamento observado para os prótons olefínicos ($J = 16,0$ Hz).

O espectro de ^{13}C -RMN confirmou a existência de duas ligações duplas (três grupos metino com hibridação sp^2 a δ_{C} 136,0, 130,8 e 121,0 e um carbono quaternário a 131,4) e de seis carbonos com funções oxigenadas, um dos quais quaternário (δ_{C} 91,1, 79,5, 79,4, 77,4, 72,2 e 68,2). Na região alifática observaram-se ainda sinais correspondentes a dez carbonos: cinco grupos metilo (δ_{C} 22,4, 20,4, 20,1, 15,9 e 13,3), um grupo metileno (δ_{C} 43,5), três grupos metinos (δ_{C} 48,9, δ_{C} 38,4 e δ_{C} 37,2) e um carbono quaternário (δ_{C} 39,4).

Com base nos dados referidos, foi calculada a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_6$ para o álcool diterpénico correspondente a este composto que corresponde a um índice de insaturação de quatro. Tendo sido demonstrada a existência de duas insaturações no anel, foi atribuída uma estrutura bicíclica ao composto.

O espectro de HMQC possibilitou a correlação ^1H - ^{13}C da maior parte dos carbonos, exceptuando alguns casos em que, devido a proximidade excessiva dos desvios químicos, as atribuições poderão ser permutáveis (cf. Tabela 2.3).

As correlações 3J e 4J entre os prótons vicinais e alílicos foram evidenciadas pelo espectro de ^1H - ^1H -COSY, que, juntamente com o espectro de HMQC, permitiu definir dois fragmentos de prótons acoplados constitutivos da molécula (Figura 2.7).

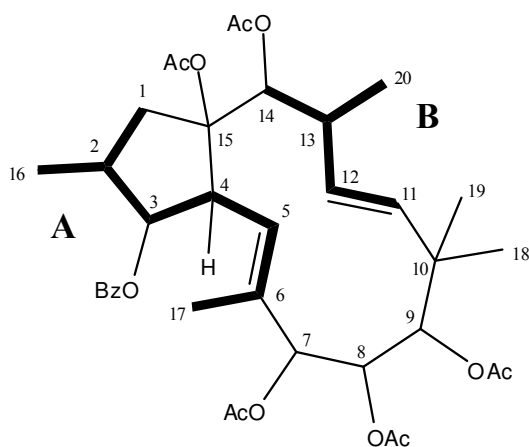


Figura 2.7 – Fragmentos estruturais (A, B), estabelecidos através das experiências de ^1H - ^1H COSY e HMQC, do eufomelifereno A.

Tabela 2.3 – Espectros de ^1H e ^{13}C -RMN e correlações observadas nas experiências ^1H - ^1H COSY e HMBC (C→H) do eufomelifereno A [400 MHz (^1H), 100,61 MHz (^{13}C), CDCl_3 , δ (ppm) (J em Hz)].

Posição	^1H	^{13}C	DEPT	COSY	HMBC (C→H)
1 α	2,13* <i>m</i>	43,5	CH_2	2	3, 16
1 β	2,59** <i>m</i>	43,5	CH_2	2	3, 16
2	2,59** <i>m</i>	37,2	CH	1, 3, 16	1, 16
3	5,43 <i>t</i> (3,6)	79,5*	CH	2, 4	1, 4, 5, 16
4	3,02 <i>dd</i> (3,6; 9,2)	48,9	CH	3, 5	1, 13
5	5,70 <i>d</i> (9,2)	121,1	CH	4, 17	4, 7, 17
6	-	131,4	C	-	3, 4, 7, 17
7	4,94 <i>s</i>	77,4	CH	-	5, 9, 17
8	5,03 <i>s</i>	68,2	CH	-	7
9	5,13 <i>s</i>	72,2	CH	-	7, 19, 20
10	-	39,4	C	-	12, 18, 19
11	5,11 <i>d</i> (16,0)	136,0	CH	12	9, 13, 18, 19
12	5,67 <i>d</i> (8,4; 16,0)	130,8	CH	11, 13	13, 14, 20
13	2,59** <i>m</i>	38,4	CH	12, 14, 20	11, 20
14	5,01 <i>d</i> (2,4)	79,4*	CH	13	1, 12, 13, 20
15	-	91,1	C	-	1, 3, 13
16	0,96 <i>d</i> (6,4)	13,3	CH_3	2	1
17	1,89 <i>s</i>	15,9	CH_3	5	5, 7
18	1,00 <i>s</i>	22,4	CH_3	-	9, 11
19	0,87 <i>s</i>	20,4	CH_3	-	9, 11
20	0,96 <i>d</i> (6,4)	20,1	CH_3	13	13
7-OAc	C=O	-	C	-	7, 7-OAc
	Me	1,14	CH_3	-	
8-OAc	C=O	-	C	-	8, 8-OAc
	Me	2,08	CH_3	-	
9-OAc	C=O	-	C	-	9, 9-OAc
	Me	2,06	CH_3	-	
14-OAc	C=O	-	C	-	14, 14-OAc
	Me	2,17***	CH_3	-	
15-OAc	C=O	-	C	-	15-OAc
	Me	2,33	CH_3	-	
3-Obz	C=O	-	C	-	3, 2', 6'
	1'	-	C	-	3', 5'
	2'	7,97 <i>d</i> (7,2)	CH	3'	2' - 6'
	3'	7,44 <i>t</i> (7,6)	CH	2', 4'	3', 5'
	4'	7,55 <i>t</i> (7,2)	CH	3', 5'	2', 6'
	5'	7,44 <i>t</i> (7,6)	CH	4', 6'	3', 5'
	6'	7,97 <i>d</i> (7,2)	CH	5'	2' - 6'

*,** Sinais sobrepostos; *,** Atribuições permutáveis

A interligação entre os fragmentos estabelecidos pelos espectros de HMQC e COSY coube ao espectro de HMBC. As correlações $^2J_{\text{C-H}}$ C-6/H-7, $^3J_{\text{C-H}}$ C-5/H-7 e $^3J_{\text{C-H}}$ C-7/Me-17 permitiram ligar o fragmento **A** a H-7, que mostrou uma forte heterocorrelação ($^2J_{\text{C-H}}$) com o carbono C-8. Por outro lado, também C-11 apresentou uma correlação $^3J_{\text{C-H}}$ com H-9, estabelecendo a ligação entre o fragmento **B** e aquele próton. A ligação do carbono quaternário em C-15 (δ_{C} 91,1) ao fragmento **A** foi possibilitada devido à interação $^3J_{\text{C-H}}$ entre δ_{C} 91,1/H-3. A existência de dois grupos metilo geminais foi comprovada pelas correlações dos metilos a δ_{H} 1,00 e δ_{H} 0,87 com os carbonos C-11 e C-9 ($^3J_{\text{C-H}}$) e com o carbono 10 ($^2J_{\text{C-H}}$).

As interações $^3J_{C-H}$ entre C-18/Me-19 e C-19/Me-18 corroboraram esta característica estrutural.

O espectro de HMBC permitiu ainda localizar as funções éster através das heterocorrelações a três ligações observadas entre os carbonos carbonílicos e os prótons oximetínicos correspondentes, bem como atribuir os grupos metilo dos grupos acetilo: o carbonilo a campo mais alto (δ_C 165,0) foi atribuído ao carbonilo do grupo benzoato devido à correlação $^3J_{C-H}$ com os prótons *orto* do anel aromático (duplete a δ_H 7,97). A correlação $^3J_{C-H}$ entre o carbonilo a δ_C 165,0 e o sinal a δ_H 5,43 (H-3) localizou inequivocamente o grupo benzoílo nesta posição. O carbonilo a δ_C 171,4 apresentou correlações $^3J_{C-H}$ com o próton a δ_H 5,01 e $^2J_{C-H}$ com o próton δ_H 2,17 (o que permitiu localizar este substituinte em C-14); o carbonilo a δ_C 170,2 apresentou correlações $^3J_{C-H}$ com o próton a δ_H 5,03 e $^2J_{C-H}$ com o grupo metilo a δ_H 2,08; o carbonilo a δ_C 169,4 apresentou apenas um acoplamento $^2J_{C-H}$ com o sinal a δ_H 2,33; o carbonilo a δ_C 169,2 apresentou $^3J_{C-H}$ com δ_H 5,13 e $^2J_{C-H}$ com δ_H 2,06; o carbonilo a δ_C 168,8 apresentou $^3J_{C-H}$ com δ_H 4,94 e $^2J_{C-H}$ com δ_H 1,14.

A estereoquímica relativa do eufomelifereno A foi estabelecida pela análise do espectro de NOESY, tendo-se assumido uma orientação α para o próton H-4 (cf. Tabela 2.4 e Figura 2.8).

Tabela 2.4 – Principais interações de NOE observadas para o eufomelifereno A.

Posição	NOESY
1 α	3, 4, 14
1 β	-
2	16
3	1 α , 4, 16 ou 20, 17
4	1 α , 2 ou 13, 3, 13, 14, 17
5	18, 15-OAc
7	17
8	17, 19, 20
9	5, 12, 17, 18, 15-OAc
11	13
12	9, 18
13	4, 11, 20
14	1 α , 2, 4
16	-
17	3, 4, 7, 8
18	9, 12
19	8
20	-

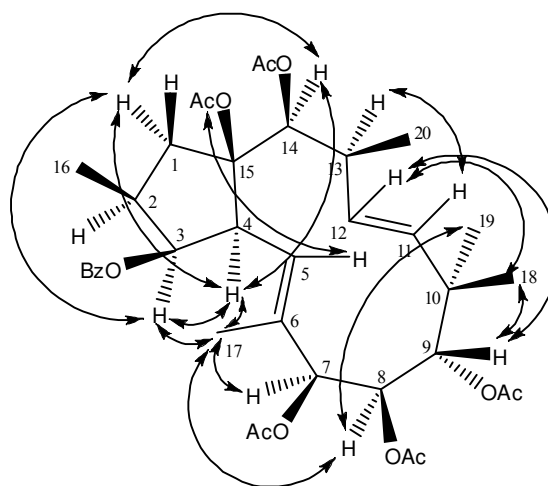


Figura 2.8 – Principais efeitos de NOE observados para o eufomelifereno A.

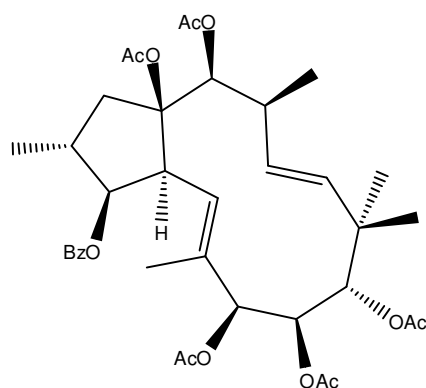
As fortes correlações entre H-4/H-3, H-4/H-1 α e H-4/H-14 permitiram atribuir a configuração β do benzoato em C-3 e do éster em C-14 e definir H-1 α , tendo sido reforçadas pelas fortes interações observadas entre H-1 α /H-3 e H-1 α /H-14. A fusão *trans* dos anéis é concordante com a interação de NOE entre 15-OMe e os prótons *orto* do anel aromático em C-3; tal poderá justificar o desvio químico do metilo do éster em C-15 para campos particularmente baixos – efeito de desblindagem do anel aromático. A proximidade dos valores dos desvios químicos de H-2/H-13 e a sobreposição dos sinais correspondentes aos grupos metilo Me-16/Me-20 dificultaram a definição da estereoquímica nestes dois centros quirais. De qualquer forma, a constante de acoplamento encontrada para H-3 ($J = 3,6$ Hz) é concordante com uma estereoquímica Me-16 β e H-3 α ao contrário do verificado para a eufomeliferrina (Yamamura *et al*, 1981; Hohmann *et al*, 1999; Valente *et al*, 2003; Jakupovic *et al*, 1998; Hohmann *et al*, 2002; Appendino *et al*, 1998; Liu *et al*, 2001). Por outro lado, a comparação dos desvios químicos e das constantes de acoplamento com os de um composto que apenas apresenta estereoquímica inversa em C-2 previamente isolado de *Euphorbia platyphyllos* L. (Hohmann *et al*, 2003a) permitiu corroborar as estereoquímicas em C-2 e C-14 e definir a estereoquímica em C-13 (cf. Tabela 2.5 e Tabela 2.6).

Tabela 2.5 – Estudo comparativo dos desvios químicos e constantes de acoplamento (δ_H e J).

Composto	H-2		H-3		H-13		H-14		Me-16		Me-20	
	δ_H	J	δ_H	J	δ_H	J	δ_H	J	δ_H	J	δ_H	J
Eufomelifereno A	2,13	<i>m</i>	5,43	<i>t</i> (3,6)	2,59	<i>m</i>	5,01	<i>d</i> (2,4)	0,96	<i>d</i> (6,4)	0,96	<i>d</i> (6,4)
Composto 12 (Hohmann <i>et al</i>)	2,35	<i>m</i>	4,94	<i>t</i> (7,1)	2,58	<i>m</i>	5,01	<i>d</i> (2,7)	1,10	<i>d</i> (6,9)	0,96	<i>d</i> (7,0)
$ \Delta $	0,22	-	0,49	3,5	0,01	-	0,00	0,3	0,14	0,5	0,00	0,6

Tabela 2.6 – Estudo comparativo dos desvios químicos (δ_C).

Composto	C-2	C-3	C-13	C-14	Me-16	Me-20
Eufomelifereno A	37,2	79,5	38,4	79,4	13,3	20,1
Composto 12 (Hohmann <i>et al</i>)	37,6	82,3	38,6	80,8	17,4	20,0
$\Delta\delta_C$	-0,4	- 2,8	- 0,2	- 1,4	-4,1	0,1

**Figura 2.9** – Estrutura do composto **12** (Hohmann *et al*, 2003).

Efectivamente, as diferenças mais acentuadas nos desvios químicos e constantes de acoplamento nos estereocentros 2, 3 e 16 corroboraram a estereoquímica inversa em C-2 para o composto em estudo (Me-16 β) e as semelhanças dos desvios químicos e constantes de acoplamento nos estereocentros 13 e 14 conduziram à atribuição da configuração Me-20 β e reforçaram a atribuição da estereoquímica H-14 α previamente realizada. As correlações 15-OAc/H-5, H-3/Me-17, H-4/Me-17 e a inexistência de interação H-5/Me-17 confirmaram o carácter *trans* da dupla entre C-5 e C-6 e situaram o grupo metil Me-17 abaixo do plano do anel. Esta conclusão aliada à correlação forte Me-17/H-7, estabeleceu a configuração α para o éster em C-7. Esta configuração, à semelhança do verificado para o eufomeliferina, foi reforçada pelo marcante efeito de NOE do grupo metilo do substituinte acetilo em C-7 com os prótons *orto* e *meta* do anel aromático e pelo seu desvio a campo particularmente alto (δ_H

1,14) atribuído ao efeito de blindagem do anel. A correlação H-13/H-11 e a inexistência de correlação H-11/H-12 confirmou o carácter *trans* da dupla em C-11/C-12. Sendo assim, as correlações H-12/H-9 e H-12/Me-18 permitiram atribuir uma orientação β ao éster em C-9 e atribuir os grupos metilo geminais Me-18 e Me-19; estas atribuições vieram reforçadas pela correlação Me-18/H-9. A interacção do grupo metilo Me-19 (δ_H 0,87) com o protão H-8 permitiu atribuir a configuração β do acetato nesta posição, corroborada pelo intenso NOE entre Me-17/H-8.

2.1.1.3 *Eufomelifereno B* (7 β ,8 β ,9 α ,14 β -tetracetoxi-3 β -benzoiloxi-15 β -hidroxi-2 α H,13 α H-jatrofa-5E,11E-dieno)

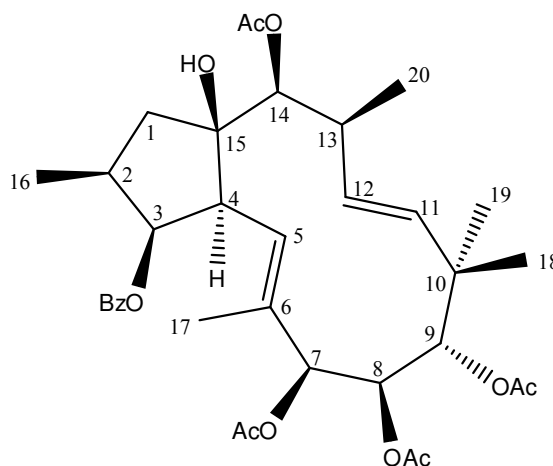


Figura 2.10 – Estrutura do eufomelifereno B (**3**).

O composto **3**, isolado sob a forma de um pó branco com carácter levógiro ($[\alpha]_D^{20} = -18^\circ$), é um composto novo que se designou por eufomelifereno B (**3**), ao qual foi atribuída a estrutura 7 β ,8 β ,9 α ,14 β -tetracetoxi-3 β -benzoiloxi-15 β -hidroxi-2 α H,13 α H-jatrofa-5E,11E-dieno. A fórmula molecular $C_{35}H_{46}O_6$ foi estabelecida com base no ião a m/z 665 $[M+Na]^+$ do espectro de ESI-MS do composto.

O espectro de infravermelho exibiu o mesmo tipo de bandas que o eufomelifereno A e uma absorção adicional a 3373 cm^{-1} que sugeriu a existência de um grupo hidroxilo livre.

Os espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN revelaram a presença de cinco grupos éster: quatro grupos acetilo e um benzoílo (cf. Tabela 2.8). Os restantes dados de ^1H -RMN e de ^{13}C -RMN e respectivas correlações nos espectros de RMN bidimensionais evidenciaram que o

eufomelifereno B apenas difere do eufomelifereno A devido à existência de um grupo hidroxilo em C-15. Esta conclusão veio reforçada pelo forte efeito diamagnético verificado em C-15 ($\Delta\delta_C = 8,4$), característico desta substituição (Corea *et al*, 2004; Corea *et al*, 2005; Wang *et al*, 2002; Marco *et al*, 1999; Jakupovic *et al*, 1998) (cf. Tabela 2.7). Além disso, a variação encontrada para a generalidade dos desvios químicos nos carbonos β é concordante com os efeitos resultantes da substituição de um grupo acilo por um grupo hidroxilo (Stothers, 1972) (cf. Tabela 2.7).

Tabela 2.7 – Comparação dos desvios químicos do eufomelifereno A (2) e eufomelifereno B (3).

Posição	Eufomelifereno A	Eufomelifereno B	$\Delta\delta_C$
1 (β)	43,5	47,4	+ 3,9
2	37,2	36,4	- 0,8
3	79,5 [•]	81,3	+ 1,8
4 (β)	48,9	47,1	- 1,8
5	121,1	122,7	+ 1,6
6	131,4	130,1 [•]	- 1,3
7	77,4	77,9	+ 0,5
8	68,2	68,2	0,0
9	72,2	72,3	+ 0,1
10	39,4	39,0	- 0,4
11	136,0	134,1	- 1,9
12	130,8	132,5	+ 2,5
13	38,4	38,5	+ 0,1
14 (β)	79,4 [•]	80,8	+ 1,4
15 (α)	91,1	82,7	- 8,4
16	13,3	12,6	- 0,7
17	15,9	14,7	- 1,2
18	22,4	21,7	- 0,7
19	20,4	19,7	- 0,7
20	20,1	18,7	- 1,4

Tabela 2.8 – Espectros de ^1H e ^{13}C -RMN e correlações observadas nas experiências ^1H - ^1H COSY e HMBC (C→H) do eufomelifereno B [400 MHz (^1H), 100,61 MHz (^{13}C), MeOD, δ (ppm) (J em Hz)].

Posição	^1H	^{13}C	DEPT	^1H - ^1H COSY	HMBC (C→H)
1 α	1,75 <i>t</i> (12,8)	47,4	CH ₂	1 β , 2	3, 4, 16
1 β	2,12 <i>t</i> (12,8)	47,4	CH ₂	1 α , 2	3, 4, 16
2	2,22*	36,4	CH	1 α , 1 β , 3, 16	1, 16
3	5,41 <i>bs</i>	81,3	CH	2, 4	1, 4, 16
4	3,11 <i>dd</i> (4,0; 10,0)	47,1	CH	3, 5	1, 14
5	5,82 <i>d</i> (10,0)	122,7	CH	4, 17	4, 17
6	-	130,1 [•]	C	-	4, 7, 17
7	4,91 <i>s</i>	77,9	CH	-	8, 17
8	5,08 <i>s</i>	68,2	CH	-	7
9	5,18 <i>s</i>	72,3	CH	-	7, 8, 11, 18, 19
10	-	39,0	C	-	12, 18, 19
11	5,06 <i>d</i> (15,6)	134,1	CH	12	18, 19
12	5,95 <i>dd</i> (8,4; 15,6)	132,5	CH	11, 13	11, 14, 20
13	2,68 <i>bs</i>	38,5	CH	11, 12, 14, 20	11, 14, 20
14	4,97 <i>s</i>	80,8	CH	13	20
15	OH	82,7	C	-	1, 3
16	0,95** <i>m</i>	12,6	CH ₃	2	1
17	1,87 <i>s</i>	14,7	CH ₃	5	7
18	1,00 <i>s</i>	21,7	CH ₃	-	11, 19
19	0,86 <i>s</i>	19,7	CH ₃	-	9, 11, 18
20	0,95** <i>m</i>	18,7	CH ₃	13	14
7-OAc	C=O	169,5	C	-	7, 7-COCH ₃
	Me	1,13 <i>s</i>	19,5****	CH ₃	-
8-OAc	C=O	170,4	C	-	8, 8-COCH ₃
	Me	2,06*** <i>s</i>	19,5****	CH ₃	-
9-OAc	C=O	169,7	C	-	9, 9-COCH ₃
	Me	2,06*** <i>s</i>	18,5	CH ₃	-
14-OAc	C=O	171,8	C	-	14, 14-COCH ₃
	Me	2,22* <i>s</i>	19,5****	CH ₃	-
3-Obz	C=O	165,8	C	-	3, 2', 6'
	1'	130,0 [•]	C	-	2'- 6'
	2'	8,12 <i>d</i> (7,6)	CH	3'	3', 4'
	3'	7,52 <i>t</i> (7,6)	CH	2', 4'	-
	4'	7,62 <i>t</i> (7,6)	CH	3', 5'	2', 6'
	5'	7,52 <i>t</i> (7,6)	CH	4', 6'	-
	6'	8,12 <i>d</i> (7,6)	CH	5'	4', 5'

*, **, ***, **** Sinais sobrepostos; [•] Atribuições permutáveis

A estereoquímica do eufomelifereno B foi investigada através de uma experiência NOESY (cf. Tabela 2.9 e Figura 2.11). Considerando a habitual orientação α para o próton H-4, estabeleceu-se uma configuração α para o próton H-3, H-13 e H-14, com base nos efeitos de NOE entre H-4/H-3, H-4/H-13 e H-4/H-14. O forte efeito de NOE entre H-3/H-2 definiu a estereoquímica β do grupo metilo Me-16, corroborada pelo efeito de NOE H-14/H-2. A interação entre H-14/H-1 α possibilitou a atribuição do próton H-1 α . Por sua vez, as correlações H-3/H-17, H-4/H-17, H-17/H-7 e H-17/H-8 permitiram definir a configuração α dos prótons H-7 e H-8. Permitiram ainda, em associação com as interações H-8/H-19 e H-18/H-9 atribuir uma estereoquímica β para o próton H-9. Os efeitos nucleares de Overhauser

entre H-9/H-5, H-7/Me-17 e H-8/Me-17 e a inexistência de interacção entre H-5/Me-17 confirmaram o carácter *trans* da ligação dupla entre C-5/C-6; o mesmo se verificou para a ligação dupla entre C-11/C-12 perante os marcados efeitos de NOE entre H-13/H-11 e H-18/H-12.

Tabela 2.9 – Principais interacções de NOE observadas para o eufomelifereno B.

Posição	NOESY
1 α	1 β , 14
1 β	1 α
2	3, 14
3	2, 4, 17
4	3, 13, 14, 17
5	9
7	17, 7-OAc
8	13, 17, 19
9	5, 18, 7-OAc, 9-OAc
11	13
12	18
13	4, 8, 11, 14
14	2, 4, 13
16	-
17	3, 4, 7, 8
18	9, 12
19	8
20	-

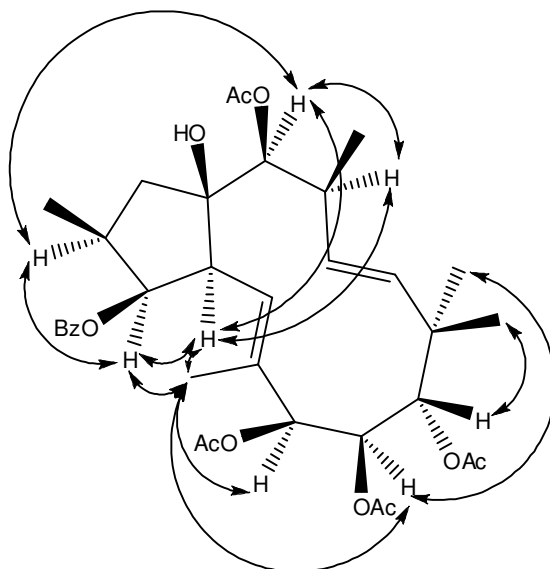


Figura 2.11 – Principais efeitos de NOE observados para o eufomelifereno B.

2.1.1.4 *Serrulatina B* ($6\beta,7\beta,8\beta,9\alpha,15\beta$ -pentacetoxi- 3β -benzoiloxi- 14 -oxo- 2β H, 3α H-jatrofa- $4E,11E$ -dieno)

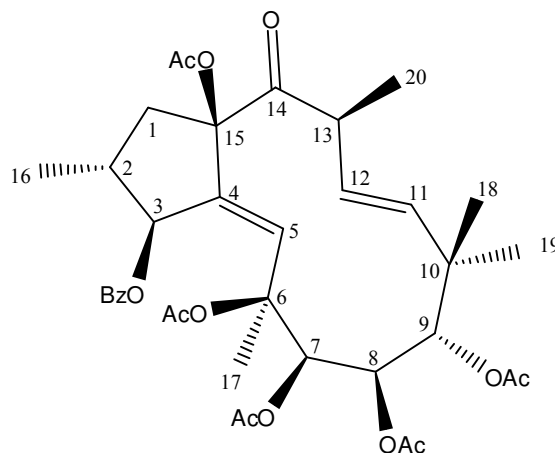


Figura 2.12 – Estrutura da serrulatina B (4).

Analisando a literatura disponível referente ao isolamento de compostos com o esqueleto do jatrofano, facilmente se conclui que este tipo de estrutura em que a insaturação envolve C-4 e C-5 é pouco frequente, comparativamente aos compostos com a ligação dupla entre C-5/C-6 e C-6/C-17. Apesar disso, este composto já foi previamente isolado do extracto metanólico de, como o nome *serrulatina* sugestivamente indica, *Euphorbia serrulata* (Hohmann *et al*, 2000; Hohmann *et al*, 2002), não existindo qualquer referência prévia ao isolamento de jatrofanos com insaturação entre C-4/C-5.

A fórmula molecular $C_{37}H_{46}O_{13}$ é consistente com o ião $[M+Na]^+$ a m/z 721 observado no espectro de ESI-MS do composto.

O espectro de infravermelho da serrulatina B apresentou absorções típicas de grupos carbonilos, sob forma de uma banda intensa a 1740 cm^{-1} .

O espectro de ^1H -RMN evidencia a presença de um benzoato (δ_{H} 8,10, d , $J=8,2\text{ Hz}$; δ_{H} 7,56, t , $J=7,6\text{ Hz}$; δ_{H} 7,44, t , $J=7,4\text{ Hz}$), confirmada pelo espectro de ^{13}C -RMN (δ_{C} 165,6) (cf. Tabela 2.10). Este último revelou ainda a existência de cinco ésteres adicionais (δ_{C} 171,1; δ_{C} 170,4, δ_{C} 169,8, δ_{C} 169,8 e δ_{C} 169,3) e de um grupo cetona (δ_{C} 204,1). Além disso, sugeriu a existência de uma ligação dupla dissustituída e outra trissustituída (δ_{C} 141,5; δ_{C} 126,9; δ_{C} 138,3 e δ_{C} 137,4), quatro oximetinos (δ_{C} 77,2, δ_{C} 75,9, δ_{C} 72,9 e δ_{C} 67,7) e dois carbonos quaternários

ligados a funções oxigenadas (δ_C 90,5 e δ_C 81,6). Na região alifática, exibiu ainda sinais correspondentes a 10 grupos metilo, um metileno e dois grupos metinos. O espectro de ^1H -RMN confirmou, além da existência de cinco grupos metilo de grupos acetilo, dois grupos metilo terciários e dois secundários (cf. Tabela 2.10). A campo baixo observaram-se sinais de quatro oximetinos (δ_H 5,76; δ_H 5,43; δ_H 5,38 e δ_H 5,26) juntamente com três sinais correspondentes a prótons vinílicos (δ_H 5,92; δ_H 5,78; δ_H 5,45). A comprovação da existência de um ligação dupla trans (*E*) endocíclica dissubstituída adveio da elevada constante de acoplamento entre os prótons envolvidos ($J = 16,8$ Hz).

A fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_6$ deduzida para o álcool diterpénico correspondente veio confirmar a natureza bicíclica do composto.

As experiências de ^1H - ^1H COSY, HMQC e HMBC possibilitaram a atribuição inequívoca de todos os sinais, tendo sido esta posteriormente confirmada pela literatura (Hohmann *et al*, 2002). Os dados encontram-se sumarizados na Tabela 2.10.

As principais interações no espectro NOESY (cf. Tabela 2.11) confirmaram que a estereoquímica relativa dos vários centros quirais é conforme se pode observar na Figura 2.13.

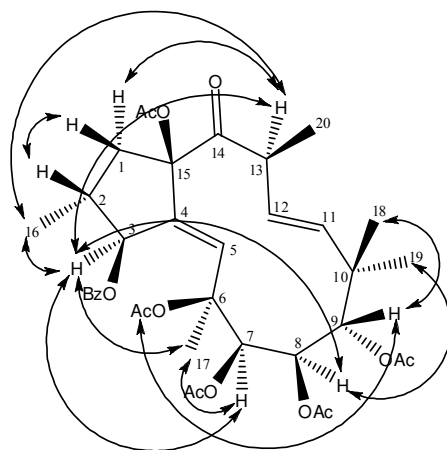


Figura 2.13 – Principais efeitos de NOE observados para a serrulatina B.

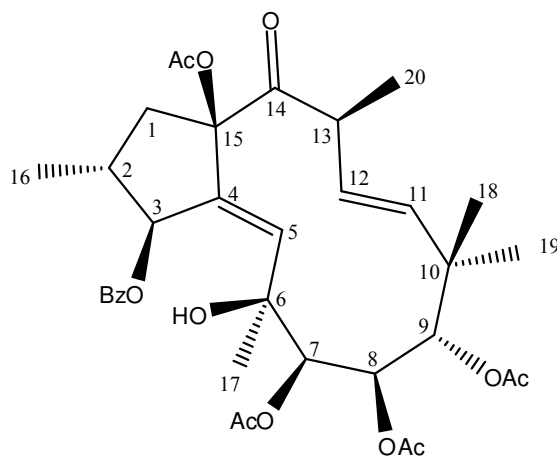
Tabela 2.10 – Espectros de ^1H e ^{13}C -RMN e correlações observadas nas experiências ^1H - ^1H COSY e HMBC (C \rightarrow H) da Serrulatina B [400 MHz (^1H), 100,61 MHz (^{13}C), CDCl_3 , δ (ppm) (J em Hz)].

Posição		^1H	^{13}C	DEPT	^1H - ^1H COSY	HMBC (C \rightarrow H)
1 α		2,03 <i>t</i> (13,2)	40,2	CH_2	1 β , 2	16
1 β		2,72 <i>dd</i> (13,2; 6,4)	40,2	CH_2	1 α , 2	16
2		2,34 <i>m</i>	40,1	CH	1 α , 1 β , 3, 16	16
3		5,76 <i>d</i> (6,0)	77,2	CH	2, 5	5, 16
4		-	137,4	C	-	1 α , 5
5		5,92 <i>s</i>	138,3	CH	3, 17	3, 17
6		-	81,6	C	-	17
7		5,26 <i>d</i> (2,8)	75,9	CH	8	9, 17
8		5,39 <i>d</i> (2,8)	67,7	CH	7	7
9		5,43 <i>s</i>	72,9	CH	-	7, 18, 19
10		-	42,1	C	-	8, 11, 18, 19
11		5,45 <i>d</i> (16,8)	141,5	CH	12	9, 18, 19
12		5,78 <i>dd</i> (16,8; 9,6)	126,9	CH	11, 13	20
13		3,75 <i>m</i>	42,9	CH	12, 20	11, 20
14		-	204,1	C	-	20
15		-	90,5	C	-	1 α , 3, 5
16		1,48 <i>d</i> (7,2)	17,2	CH_3	2	1, 2, 3
17		1,50 <i>s</i>	24,1	CH_3	5	5, 7
18		0,92 <i>s</i>	26,4	CH_3	-	9, 10, 11, 19
19		0,86 <i>s</i>	18,0	CH_3	-	9, 10, 11, 18
20		1,28 <i>d</i> (6,8)	18,8	CH_3	13	-
6-OAc	C=O	-	169,7	C	-	-
	Me	2,18 <i>s</i>	21,9	CH_3	-	?
7-OAc	C=O	-	169,8	C	-	7
	Me	2,06 <i>s</i>	20,6	CH_3	-	?
8-OAc	C=O	-	170,4	C	-	8
	Me	2,09 <i>s</i>	21,1	CH_3	-	?
9-OAc	C=O	-	169,3	C	-	9
	Me	2,14 <i>s</i>	20,9	CH_3	-	?
15-OAc	C=O	-	171,1	C	-	-
	Me	2,15 <i>s</i>	21,1	CH_3	-	?
3-Obz	C=O	-	165,6	C	-	3, 2', 6'
	1'	-	130,1	C	-	2', 6', 3', 5'
	2'	8,10 <i>d</i> (7,6)	129,9	CH	3'	2' - 6'
	3'	7,44 <i>t</i> (7,6)	128,4	CH	2', 4'	-
	4'	7,56 <i>t</i> (7,6)	133,1	CH	3', 5'	2', 6'
	5'	7,44 <i>t</i> (7,6)	128,4	CH	4', 6'	-
	6'	8,10 <i>d</i> (7,6)	129,9	CH	5'	2' - 6'

Tabela 2.11 – Principais interações de NOE observadas para a serrulatina B.

Posição	NOESY
1 α	1 β , 13
1 β	1 α , 2
2	1 β , 16
3	7, 8, 13, 16
4	-
5	8, 11, 17
7	3, 17
8	3, 5, 19
9	18, 6-OCOMe
11	5, 13, 18, 20
12	13, 17, 19
13	1 α , 3, 11, 12, 16, 20
16	2, 3, 13
17	5, 7, 12
18	9, 11
19	8, 12
20	11, 13

2.1.1.5 7 β ,8 β ,9 α ,15 β -tetracetoxi-3 β -benzoiloxi-6 β -hidroxi-14-oxo-2 β H,13 α H-jatrofa-4E,11E-dieno

**Figura 2.14** – Estrutura do composto 7 β ,8 β ,9 α ,15 β -tetracetoxi-3 β -benzoiloxi-6 β -hidroxi-14-oxo-2 β H,13 α H-jatrofa-4E,11E-dieno (**5**).

O composto **5**, isolado sob a forma de um composto branco amorfo, foi identificado como sendo o 7 β ,8 β ,9 α ,15 β -tetracetoxi-3 β -benzoiloxi-6 β -hidroxi-14-oxo-2 β H,13 α H-jatrofa-4E,11E-dieno.

Este composto é semelhante à serrulatina B (**4**) analisada anteriormente, diferindo apenas no substituinte em C-6: o acetato do composto **4** foi substituído no composto **5** por um grupo hidroxilo. Também este composto já foi anteriormente isolado a partir do extracto diclorometânico de *Euphorbia serrulata* (Hohmann *et al*, 2002). A fórmula $C_{35}H_{44}O_{12}$ mostrou-se compatível com a presença do ião a m/z 679 $[M+Na]^+$ no espectro de ESI-MS.

O espectro de infravermelho exibiu o mesmo tipo de bandas que a serrulatina B e uma absorção adicional a 3506 cm^{-1} , que evidenciou a presença de um grupo hidroxilo. A presença deste grupo hidroxilo foi suportada pelos espectros de ^1H -RMN e HMQC, mediante a existência de um singuleto largo a δ_H 3,04 sem correlações no espectro de HMQC. Além disso, os espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN confirmaram a existência de grupos acetilo e de um grupo benzoílo (cf. Tabela 2.12). As informações adicionais retiradas dos espectros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN e RMN bidimensional (cf. Tabela 2.12) evidenciaram que o composto **5** apenas difere do composto **4** por apresentar um hidroxilo em C-6. A análise comparativa dos desvios químicos nos carbonos α, β (cf. Tabela 2.13) corroborou esta conclusão mediante:

1) o forte efeito diamagnético verificado para o carbono α (C-6), cujo valor é semelhante ao encontrado para os compostos **2** e **3** ($\Delta\delta_C = 7,9$). Efectivamente, um desvio desta ordem de grandeza é característico da substituição de um grupo acilo por um hidroxilo e encontra-se vastamente reportado na literatura (Corea *et al*, 2004; Corea *et al*, 2005; Wang *et al*, 2002; Marco *et al*, 1999; Jakupovic *et al*, 1998);

2) a variação encontrada para a generalidade dos desvios químicos nos carbonos β é concordante com os efeitos resultantes da substituição de um grupo acilo por um grupo hidroxilo (Stothers, 1972).

A análise do espectro de NOESY do composto **5** (cf. Tabela 2.14 e Figura 2.15) permitiu confirmar estar-se perante um composto com a mesma estereoquímica do composto **4**.

Tabela 2.12 – Espectros de ^1H e ^{13}C -RMN e correlações observadas nas experiências ^1H - ^1H COSY e HMBC (C \rightarrow H) do composto **5** [400 MHz (^1H), 100,61 MHz (^{13}C), CDCl_3 , δ (ppm) (J em Hz)].

Posição	^1H	^{13}C	DEPT	^1H - ^1H COSY	HMBC (C \rightarrow H)
1 α	2,06 <i>t</i> (13,2)	40,1	CH_2	1 β , 2	16
1 β	2,72 <i>dd</i> (6,4; 13,2)	40,1	CH_2	1 α	16
2	2,34 <i>m</i>	40,0	CH	1 α , 3, 16	1 α , 16
3	5,88 <i>dd</i> (1,6; 5,9)	77,4	CH	2, 5	1 β , 2, 5, 16
4	-	137,8	C	-	1 β , 5
5	6,01 <i>d</i> (1,6)	141,7 *	CH	3	3, 7, 17
6	3,04 (<i>bs</i>)	73,7	C	-	5, 7, 17
7	5,28 <i>d</i> (2,4)	75,8	CH	8	9, 17
8	5,40 <i>d</i> (2,4)	67,6	CH	7	7
9	5,69 <i>s</i>	73,7	CH	-	7, 11, 18, 19
10	-	41,6	C	-	8, 9, 18, 19
11	5,49 <i>d</i> (16,4)	141,6 *	CH	12	9, 13, 18, 19
12	5,76 <i>dd</i> (9,2; 16,4)	127,2	CH	11, 13	13, 20
13	3,72 <i>m</i>	43,2	CH	12, 20	11, 12, 20
14	-	204,1	C	-	12, 20
15	-	90,5	C	-	1 β , 3, 5
16	1,44 <i>d</i> (6,8)	17,0	CH_3	2	1 α , 3
17	1,14 <i>s</i>	27,9	CH_3	-	-
18	0,93 <i>s</i>	25,8	CH_3	-	9, 11, 19
19	0,88 <i>s</i>	18,0	CH_3	-	9, 11, 18
20	1,27 <i>d</i> (7,2)	18,5	CH_3	13	-
6-OH	3,03 <i>bs</i>	-	-	-	-
7-OAc	C=O	169,0	C	-	7, 7-OAc
	Me	20,4	CH_3	-	-
8-OAc	C=O	170,4 **	C	-	8, 8-OAc
	Me	21,0	CH_3	-	-
9-OAc	C=O	170,3 **	C	-	9, 9-OAc
	Me	21,1	CH_3	-	-
15-OAc	C=O	170,9	C	-	15-OAc
	Me	21,0	CH_3	-	-
	C=O	165,5	C	-	3, 2', 6'
	1'	130,1	C	-	2' - 6'
	2'	8,08 <i>d</i> (7,6)	CH	3'	3', 4', 5'
3-Obz	3'	7,44 <i>t</i> (7,6)	CH	2', 4'	3', 5'
	4'	7,56 <i>t</i> (7,6)	CH	2' - 6'	2', 6'
	5'	7,44 <i>t</i> (7,6)	CH	4', 6'	3', 5'
	6'	8,08 <i>d</i> (7,6)	CH	5'	3', 4', 5'

Tabela 2.13 – Comparação dos desvios químicos dos carbonos C-5, C-6, C-7 e C-17 da serrulatina B (**4**) e do composto **5**.

^{13}C	Serrulatina B (4) δ (ppm)	Composto 5 δ (ppm)	$\Delta\delta$ OAc \rightarrow OH
C-6 (α)	81,6	73,7	- 7,9
C-5 (β)	138,3	141,7	+ 3,4
C-7 (β)	75,9	75,8	- 0,1
C-17 (β)	24,1	27,9	+ 3,8

Tabela 2.14 – Principais interações de NOE observadas para o composto **5**.

Posição	NOESY
1 α	1 β , 13
1 β	1 α , 2
2	1 β , 16
3	7, 8, 16, 17
4	-
5	8, 9, 11, 17
6-OH	9
7	3, 17
8	3, 5, 13, 19
9	5, 18, 6-OH
11	5, 13, 18, 20
12	13, 19
13	1 α , 8, 11, 12, 20
16	2, 3
17	3, 5, 7,
18	9, 11
19	8, 12
20	11, 13

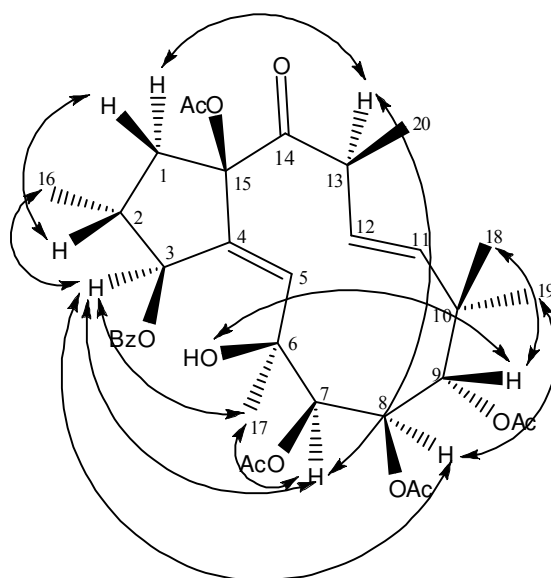


Figura 2.15 – Principais efeitos de NOE observados para o composto **5**.

2.1.2 20-desoxi-ingenol

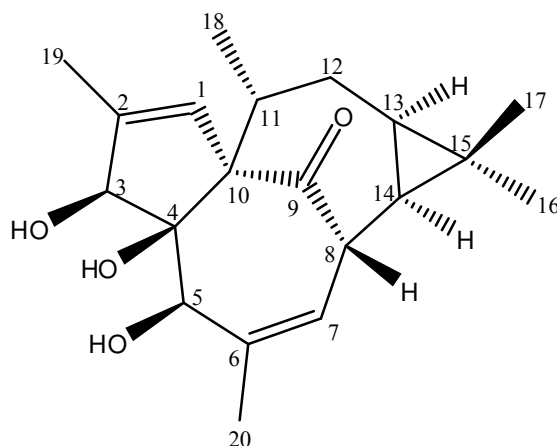


Figura 2.16 – Estrutura do 20-desoxi-ingenol (**6**).

O 20-desoxi-ingenol (**6**) foi isolado pela primeira vez a partir do extracto etanólico de *Euphorbia kansui* Liou (Uemura *et al*, 1974). São vastas as referências ao isolamento de compostos com o esqueleto do ingenano a partir de espécies dos género *Euphorbia*, nomeadamente de *Euphorbia canariensis* (Marco *et al*, 1997), *Euphorbia segetalis* (Jakupovic *et al*, 1998c), *Euphorbia lathyris* (Appendino *et al*, 1999), *Euphorbia acruensis* (Marco *et al*, 1998), *Euphorbia quinquecostata* (Mbwambo *et al*, 1996), *Euphorbia leuconera* (Vogg *et al*, 1999) e *Euphorbia esula* (Halawish *et al*, 2002). O 20-desoxi-ingenol apresentou-se sob a forma de um composto amorfo, tendo sido a sua fórmula molecular $C_{20}H_{28}O_4$ deduzida a partir do ião a m/z 355 $[M + Na]^+$ no espectro de massa (ESI-MS).

O espectro de infravermelho evidenciou a existência de funções hidroxilo (3448 cm^{-1}) e carbonilo (1705 cm^{-1}).

O espectro de ^1H -RMN (cf. Tabela 2.15) indicou a existência de dois protões vinílicos (δ_{H} 6,01, s; 5,77, d, $J = 3,6\text{ Hz}$), dois protões oximetínicos (δ_{H} 4,43 e 3,46), quatro metilos ligados a carbonos totalmente substituídos dos quais dois são olefínicos (δ_{H} 1,87, δ_{H} 1,79) e dois ligados a carbonos sp^3 (δ_{H} 1,13 e δ_{H} 1,08), um metilo secundário (δ_{H} 1,00, d, $J = 7,6\text{ Hz}$), e um sinal a campo muito alto, a δ_{H} 0,70, típico de protões em anéis ciclopropânicos, sob a forma de um quadripleto ($J = 8\text{ Hz}$).

No espectro de ^{13}C -RMN (cf. Tabela 2.16) observou-se a existência de apenas um sinal de carbono carbonílico, com um desvio químico típico de cetona (δ_{C} 207,3). O referido espectro

revelou ainda a existência de quatro carbonos olefínicos (δ_C 138,5, 138,3, 130,8 e 123,6), dois dos quais quaternários, evidenciando, juntamente com as informações do espectro de ^1H -RMN, a existência de duas ligações duplas trissubstituídas. Mostrou também sinais correspondentes a dois oximetinos (δ_C 81,2 e 76,3) e a dois carbonos quaternários igualmente a campo baixo (δ_C 84,5 e 72,4). Na região alifática observaram-se: um carbono quaternário (δ_C 24,0), quatro grupos metino (δ_C 44,0, 40,3, 23,2 e 22,9), um grupo metileno (δ_C 30,9) e cinco metilos (δ_C 28,5, 22,1, 17,2, 15,4 e 15,4). Os valores a campo particularmente alto do carbono quaternário a δ_C 24,0 e dos dois metinos a δ_C 23,2 e 22,9 corroboraram a existência de um anel ciclo-propano na estrutura da molécula.

A fórmula $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_4$ é consistente com um índice de insaturação sete implicando uma estrutura tetracíclica para o composto em análise.

Os espectros bidimensionais de RMN, nomeadamente, ^1H - ^1H -COSY, HMQC e HMBC permitiram estabelecer algumas correlações. No entanto, a sobreposição de alguns sinais não possibilitou a sua completa atribuição com base apenas nos dados obtidos tendo-se para isso recorrido a literatura referente não ao 20-desoxi-ingenol mas a alguns dos seus derivados esterificados (Wang *et al*, 2003; Marco *et al*, 1998; Marco *et al*, 1999; Jakupovic *et al*, 1998c).

Tabela 2.15 – Espectro de ^1H -RMN do 20-desoxi-ingenol [400 MHz (^1H), CDCl_3 , δ (ppm) (*J* em Hz)].

Posição	^1H
1	6,01 <i>s</i>
3	4,43 <i>s</i>
5	3,46 <i>s</i>
7	5,77 <i>d</i> (3,6)
8	4,04 <i>dd</i> (3,6; 10,8)
13	0,70 <i>q</i> (8,0)
16	1,08 <i>s</i>
17	1,13 <i>s</i>
18	1,00 <i>d</i> (7,6)
19	1,87 <i>s</i>
20	1,79 <i>s</i>

Tabela 2.16 – Espectro de ^{13}C -RMN e correlações observadas nas experiências ^1H - ^1H COSY e HMBC ($\text{C} \rightarrow \text{H}$) do 20-desoxi-ingenol [400 MHz (^1H), 100,61 MHz (^{13}C), CDCl_3 , δ (ppm) (J em Hz)].

Posição	^{13}C	DEPT	^1H - ^1H COSY	HMBC ($\text{C} \rightarrow \text{H}$)
1	130,8	CH	19	3, 19
2	138,3	C	-	3, 19
3	81,2	CH	19	19
4	84,5	C	-	1, 3
5	76,3	CH	7, 20	3, 20
6	138,5	C	-	20
7	123,6	CH	5, 8, 20	20
8	44,0	CH	7, 14, 20	-
9	207,3	C	-	-
10	72,4	C	-	1, 3, 18
11	40,3	CH	12, 18	18, 19
12 α	30,9	CH ₂	11, 13	18
12 β				
13	22,9	CH	12, 14	12, 16, 17
14	23,2	CH	8, 13	16, 17
15	24,0	C	-	16, 17
16	28,5	CH ₃	-	14, 17
17	15,4	CH ₃	-	16
18	17,2	CH ₃	11	-
19	15,4	CH ₃	1, 3	1
20	22,1	CH ₃	5, 7, 8	-

A estereoquímica dos centros quirais do composto foi evidenciada pelo seu espectro de NOESY, mediante o qual se comprovou tratar-se indubitavelmente do 20-desoxi-ingenol (cf. Tabela 2.17 e Figura 2.17).

Tabela 2.17 – Principais interações de NOE observadas para o composto **6**.

Posição	NOESY
1	18, 19
3	5, 19
5	3, 20
7	20
8	11, 12 β , 17
11	8, 17
12 α	12 β , 13
12 β	8, 12 α , 17
13	12 α , 14, 16
14	13
16	13
17	8, 11, 12 β
18	1, 11
19	1, 3
20	5, 7

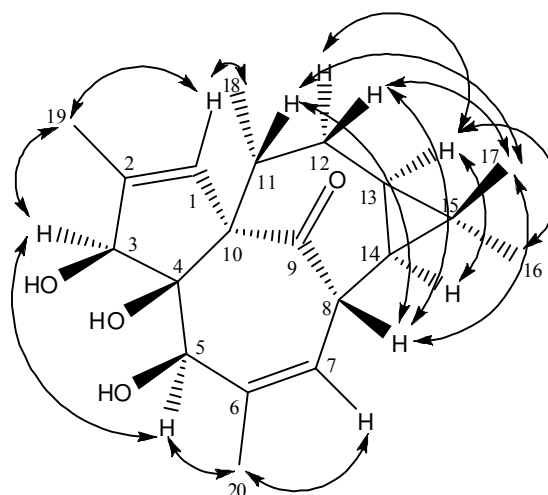


Figura 2.17 – Principais efeitos de NOE observados para o 20-desoxi-ingenol.

2.1.3 Triterpenos tetracíclicos

2.1.3.1 Eufotirucalol (19(10→9)-abeo-8 α ,9 β ,10 α -tirucal-5,25-dieno-3 β ,24-diol)

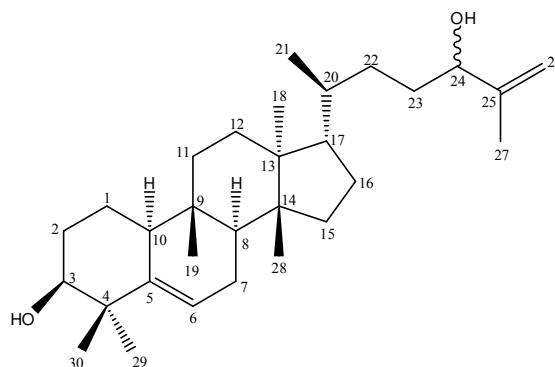


Figura 2.18 – Estrutura do composto 19(10→9)-abeo-8 α ,9 β ,10 α -tirucal-5,25-dieno-3 β ,24-diol (7).

À mistura epimérica **7** foi atribuída a estrutura 19(10→9)-abeo-8 α ,9 β ,10 α -tirucal-5,25-dieno-3 β ,24-diol que consiste, tanto quanto nos é dado a conhecer, num composto novo ao qual foi dado o nome de eufotirucalol. A sua fórmula molecular, C₃₀H₅₀O₂, é consistente com o íão molecular a m/z 442 existente no espectro de massa obtido por impacto electrónico e com o íão a m/z 465 presente no espectro FAB [M+Na]⁺.

O espectro de ¹H-RMN (cf. Tabela 2.22) revelou a existência de seis grupos metilo terciários, um dos quais adjacente a um carbono com hibridação sp² e, consequentemente,

substancialmente mais desblindado (δ_{H} 1,74, 1,16, 1,07, 0,88, 0,86 e 0,83); um grupo metilo secundário (δ_{H} 0,93, *d*, $J = 6$ Hz); três prótons olefínicos (δ_{H} 5,65, *d*, $J = 5,6$ Hz; 4,94, *bs*; 4,86, *bs*) e dois prótons geminais a grupos hidroxilo (δ_{H} 4,04, *t*, $J = 6,4$ Hz; 3,50, *bs*). O grupo hidroxilo correspondente ao sinal a 3,50 foi localizado em C-3 por razões biogênicas (Gamlath *et al*, 1988). Além disso, o facto do sinal correspondente ao próton em C-3 consistir num singlete largo implica um acoplamento equatorial-equatorial e equatorial-axial com os prótons 2α e 2β , permitindo, desta forma, atribuir uma configuração axial ao grupo OH em C-3 (cf. Tabela 2.18 e Figura 2.19).

Tabela 2.18 – Ângulos diedros e respectivos valores de J característicos de acoplamentos *vicinais* (3J) em ciclo-hexanos substituídos (Silverstein *et al*, 1998).

Acoplamento	Ângulo diedro	J caraterísticos (Hz)
Axial:axial	180°	8-10
Axial:equatorial	60°	2-3
Equatorial:equatorial	60°	2-3

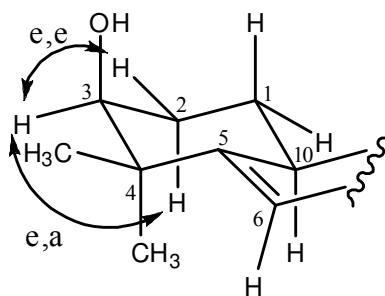


Figura 2.19 – Configuração em C-3 do eupotirucalol.

O espectro de ^{13}C -RMN (cf. Tabela 2.23), por sua vez, confirmou a existência de duas insaturações mediante a existência de carbonos olefínicos a δ_{C} 147,5 (C-25), 142,0 (C-5), 121,8 (C-6) e 111,5/ δ_{C} 111,0 (C-26). A duplicidade dos sinais obtidos para C-26 é resultante da co-existência das duas formas epiméricas em C-24 (Anjaneyulu *et al*, 1985). Este espectro confirmou ainda a existência de dois carbonos ligados a grupos hidroxilo perante a existência dos sinais a δ_{C} 76,8 e 76,40/76,36. Mais uma vez a duplicidade verificada para os últimos deve-se à estereoquímica em C-24.

A localização da ligação dupla trissubstituída no esqueleto triterpénico C-5/C-6 foi evidenciada pelo padrão de fragmentação observado no espectro de massa, com iões

proeminentes a m/z 152 e m/z 290, resultantes da clivagem *retro*-Diels-Alder do anel B típica dos triterpenos e esteróides com insaturação em C-5/C-6 (Gamlath *et al*, 1988) (cf. Figura 2.20). A presença dos iões a m/z 134 e m/z 163, derivados dos anteriores por perda de água e da cadeia lateral, respectivamente, confirmou com maior veemência esta conclusão (Gamlath *et al*, 1988). Os fragmentos acabados de referir não só fundamentam a posição da dupla ligação como também o facto de se tratar de um esqueleto 19(10 \rightarrow 9)*abeo*. Além disso, a perda de 127 unidades correspondentes à cadeia lateral é consistente com a fórmula $C_8H_{15}O$, característica de uma cadeia lateral mono-insaturada e hidroxilada.

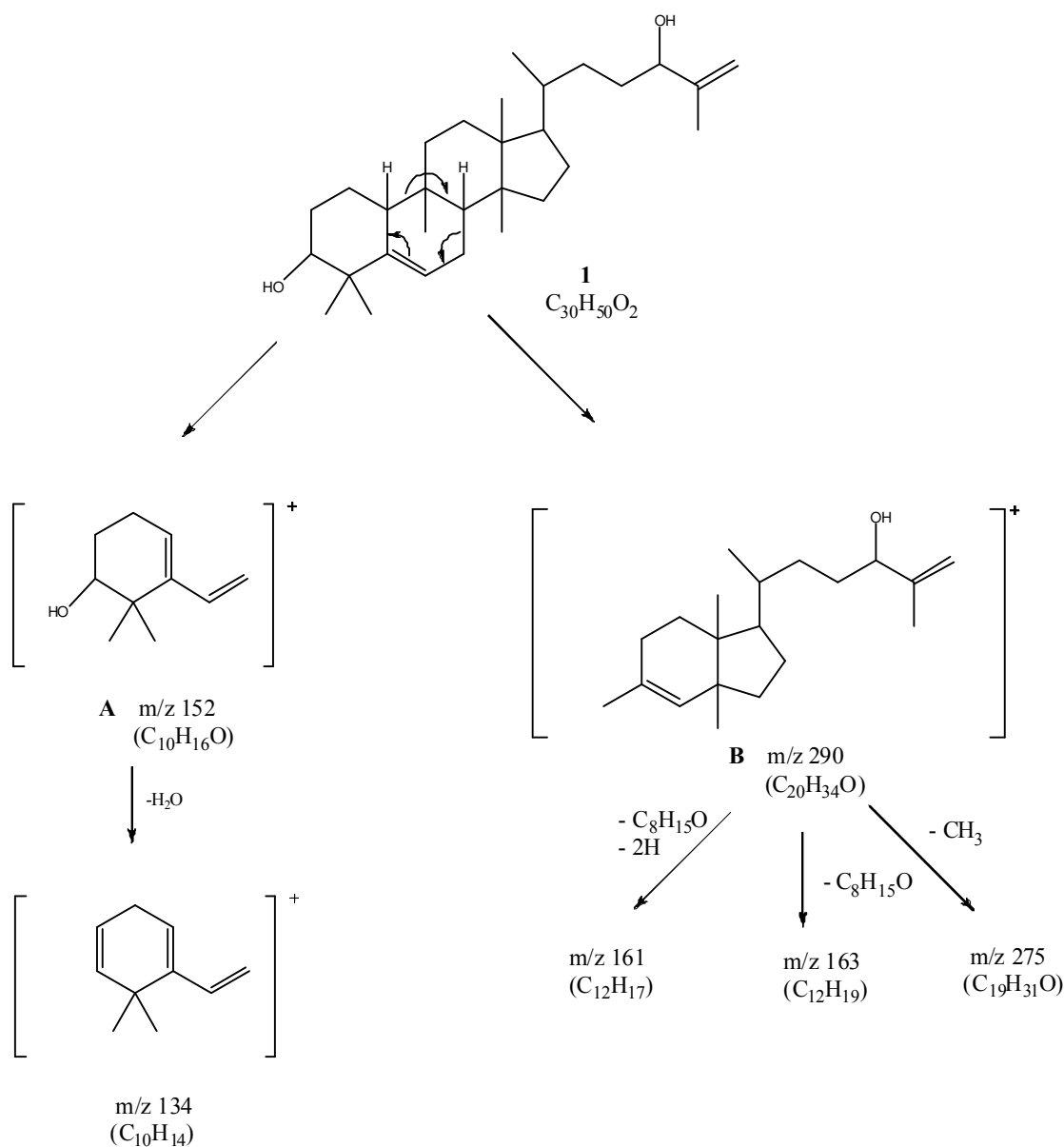


Figura 2.20 – Padrão de fragmentação em espectrometria de massa do eufotirucalol.

Os principais fragmentos observados no espectro de massa deste composto e as respectivas intensidades relativas apresentam-se na Tabela 2.19.

Tabela 2.19 – Principais fragmentos originados pela clivagem do eufotirucalol e respectivas intensidades relativas.

Ião formado	m/z (% rel)
[M] ⁺	442 (2)
[Fragmento B] ⁺	290 (27)
[Fragmento B -CH ₃] ⁺	275 (10)
[Fragmento B -cadeia lateral] ⁺	163 (59)
[Fragmento B -cadeia lateral-2H] ⁺	161 (32)
[Fragmento A] ⁺	152 (14)
[Fragmento A -H ₂ O] ⁺	134 (79)

A confirmação de que o eufotirucalano apresenta um esqueleto eufóide, derivado do catião prostano, e não um esqueleto cucurbitano, derivado do catião damarano, adveio da analogia com outros compostos conhecidos: o euferol e o boeticol (esqueleto eufóide do tipo tirucalano e eufano, respectivamente) e 10 α -cucurbita-5,24-dieno-3 β -ol (esqueleto cucurbitano) (cf. Tabela 2.20 e Figura 2.21).

Tabela 2.20 – Desvios químicos (δ_H) dos grupos metilo do esqueleto do composto **7** e analogia com compostos conhecidos.

Composto	4 α	4 β	9 β	13 α	13 β	14 α	14 β
euferol (Ferreira, 1990)	1,06	1,14	0,87	0,81	-	-	0,84
boeticol (Ferreira <i>et al</i> , 1995)	1,05	1,14	0,83	0,80	-	-	0,87
10 α -cucurbita- 5,24-dieno-3 β -ol (Itoh <i>et al</i> , 1980)	1,02	1,13	0,92	-	0,80	0,85	-
eufotirucalano	1,07	1,16	0,86	0,83	-	-	0,88

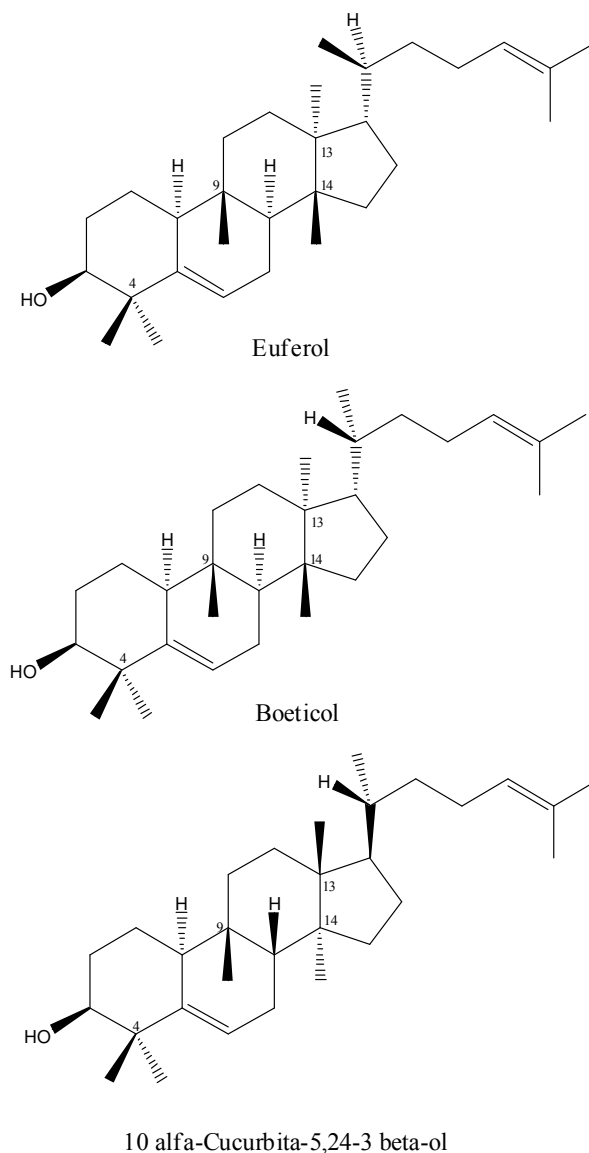


Figura 2.21 – Estruturas exemplificativas dos esqueletos eufóide (tirucalano e eufano, respectivamente) e cucurbitano.

A comparação dos desvios químicos apresentados na Tabela 2.20 sugeriu para o composto em estudo uma configuração em C-13 e C-14 igual à dos compostos eufanol e boeticol e inversa à do composto 10 α -cucurbita-5,24-dieno-3 β -ol. Sendo assim, atribuiu-se ao composto em estudo um esqueleto do tipo eufóide 19(10 \rightarrow 9) *abeo*.

Para a completa caracterização estrutural do composto resta definir a estereoquímica em C-20, passível de ser realizada mediante a análise dos efeitos nucleares de Overhauser mais significativos. No entanto, a escassez de acoplamentos de NOE observados no espectro de NOESY deste composto não permitiu aferir tratar-se de um composto com o esqueleto do

eufano (20R) ou do tirucalano (20S) pelo que se recorreu à comparação dos desvios químicos observados nos espectros de ^{13}C -RMN para estes dois tipos de esqueleto (cf. Tabela 2.21).

Tabela 2.21 – Comparação entre os desvios químicos observados nos espectros de ^{13}C -RMN para os carbonos C-17, C-20 e C-21 em compostos com os esqueletos do eufano e tirucalano.

Composto	C-17	C-20	C-21
antiquol B (Akihisa <i>et al</i> , 2002)	49,9	35,2	19,0
boeticol (Ferreira <i>et al</i> , 1995)	49,9	35,2	18,9
meliferol (Ferreira, 1990)	50,7	35,9	18,7
eufanol (Ferreira, 1990)	50,6	35,8	18,7
eufotirucalol	50,4	35,8	18,7

Com efeito, conforme se pode verificar na Tabela 2.21, é notória a semelhança entre os desvios químicos dos carbonos directamente envolvidos na configuração em questão (C-17, C-20 e C-21) do antiquol B e boeticol (compostos com esqueleto do eufano) e do meliferol e eufanol entre si (compostos com o esqueleto do tirucalano). Por sua vez, o eufotirucalol apresentou desvios químicos para os carbonos C-17, C-20 e C-21 comparáveis aos dos compostos com o esqueleto do tirucalano. Esta observação permitiu concluir estar-se perante um composto com este mesmo esqueleto. Outro factor adjuvante desta conclusão consiste no facto de ambos os compostos com o esqueleto do tirucalano acima reportados – meliferol e eufanol - terem sido isolados também da *E. mellifera* (Ferreira *et al*, 1990).

Tendo por base todas as considerações tecidas anteriormente, a atribuição dos carbonos e prótons do esqueleto do eufotirucalano foi elaborada recorrendo aos espectros bidimensionais de NMR, nomeadamente, COSY, HMQC e HMBC e por comparação com dados de RMN descritos na literatura para compostos previamente isolados com o esqueleto do eufóide, diferindo do eufotirucalano apenas na cadeia lateral (Ferreira *et al*, 1995; Akihisa *et al*, 2002; Gamlath *et al*, 1988; Ferreira, 1990; Ferreira *et al*, 1990).

Também para a cadeia lateral, as atribuições advieram dos dados espectroscópicos bidimensionais obtidos e da comparação com triterpenos existentes na literatura com cadeias laterais análogas (Pettit *et al*, 2002).

Tabela 2.22 – Espectro de ^1H -RMN do eufotirucalol [400 MHz (^1H), CDCl_3 , δ (ppm) (J em Hz)].

Posição	^1H
3	3,50 <i>bs</i>
6	5,65 <i>d</i> (5,6)
18	0,83 <i>s</i>
19	0,86 <i>s</i>
21	0,93 <i>d</i> (6,0)
24	4,04 <i>t</i> (6,4)
26	4,86 <i>bs</i> 4,94 <i>bs</i>
27	1,74 <i>s</i>
28	0,88 <i>s</i>
29	1,07 <i>s</i>
30	1,16 <i>s</i>

Tabela 2.23 – Espectros de ^{13}C -RMN, DEPT, COSY e HMBC do eufotirucalol [CDCl_3 , δ (ppm), J (Hz)].

Posição	^{13}C	DEPT	COSY	HMBC (C→H)
1 α 1 β	18,8	CH_2	2, 10	2
2 α 2 β	27,9	CH_2	1	-
3	76,7	CH	29	29, 30
4	40,9	C	-	6, 29, 30
5	142,0	C	-	29, 30
6	121,8	CH	7	-
7	25,2	CH_2	6, 8	-
8	44,5	CH	7	6, 19, 28
9	35,1	C	-	19
10	49,4	CH	1	19
11	35,7	CH_2	-	19
12	30,2	CH_2	-	11, 18
13	46,1	C	-	18, 28
14	47,4	C	-	-
15	34,2	CH_2	-	28
16	28,2	CH_2	17	-
17	50,4	CH	16, 21	18, 21
18	15,2	CH_3	-	-
19	16,5	CH_3	-	-
20	35,8	CH	21	21
21	18,7**	CH_3	17, 20	-
22	31,4	CH_2	-	21
23	32,0	CH_2	24	-
24	76,4	CH	23, 26	26, 27
25	147,5	C	-	27
26	111,0* 111,5*	CH_2	24, 27	27
27	17,6	CH_3	26	26
28	18,9**	CH_3	-	-
29	29,0	CH_3	3	30
30	25,6	CH_3	-	29

* Epímeros; ** Atribuições permutáveis

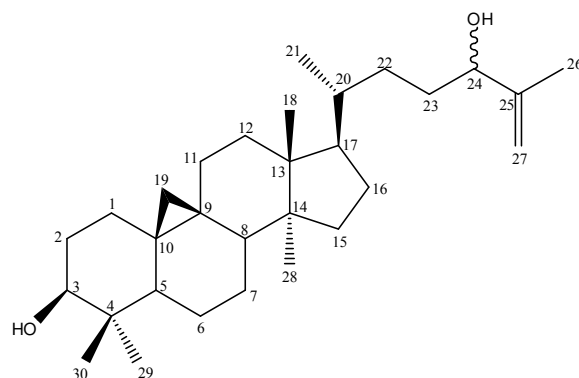
2.1.3.2 *Cicloart-25-eno-3 β ,24-diol*

Figura 2.22 – Estrutura do composto cicloart-25-eno-3 β ,24-diol (**8**).

Após análise dos vários dados espectroscópicos obtidos para o composto **8**, este foi identificado como sendo o cicloart-25-eno-3 β ,24-diol. Efectivamente, o espectro de massa substanciou a fórmula molecular $C_{30}H_{50}O_2$ ao apresentar um ião molecular a m/z 442.

O espectro de IV realçou a presença de grupos hidroxilo, mediante a existência de uma banda intensa e larga a 3380 cm^{-1} , e de uma dupla ligação terminal (897 cm^{-1}) (Silverstein *et al*, 1998).

O espectro de ^1H -RMN do composto **8** permitiu concluir tratar-se inequivocamente de um cicloartano devido à presença de dois dupletos característicos a campo alto (δ_{H} 0,35 e 0,57) (cf. Tabela 2.25). A existência de uma ligação dupla terminal foi evidenciada através de dois singletos largos a δ_{H} 4,95 e δ_{H} 4,85. Além disso, o espectro de ^1H -RMN revelou ainda a existência de cinco grupos metilo ligados a carbonos totalmente substituídos, sendo um deles olefínico (singletos a δ_{H} 1,74, 0,98, 0,91 e 0,83) e a existência de um grupo metilo secundário (duplete a δ_{H} 0,90, $J = 6,8\text{ Hz}$). O duplo duplete a δ_{H} 3,30 foi atribuído ao próton $3\alpha\text{-H}$ ($J_{\text{ae}} = 4,4\text{ Hz}$; $J_{\text{aa}} = 10,8\text{ Hz}$) e o tripleto a δ_{H} 4,04 ($J = 6,4\text{ Hz}$) ao próton geminal ao grupo hidroxilo em C-24.

O espectro de ^{13}C -RMN corroborou a existência de uma dupla ligação terminal ao apresentar dois sinais de carbonos olefínicos a δ_{C} 147,8 (C) e δ_{C} 110,9 (CH_2) (cf. Tabela 2.26). O sinal observado a δ_{C} 147,5 evidenciou a duplicidade dos sinais obtidos para C-25 que dever-se-á à co-existência de duas formas epiméricas em C-24 (Della Greca *et al*, 1994; Anjaneyulu *et al*, 1985).

O espectro de massa confirmou tratar-se de um cicloartano apresentando, entre outros, um íon diagnóstico a m/z 302, resultante da fragmentação típica de triterpenos tetracíclicos com um anel ciclopropano em 9:19 (cf. Figura 2.23 e Tabela 2.24; Ayatollahi *et al*, 1992; Aplin *et al*, 1966). Além disso, possibilitou a localização da ligação dupla terminal e de um dos grupos hidroxilo na cadeia lateral na medida em que os íons obtidos a m/z 315 $[M\text{-cadeia lateral}]^+$ e a m/z 175 $[\text{fragmento A-cadeia lateral}]^+$ são consistentes com uma perda de 127 unidades de massa, que se coaduna com a existência de uma cadeia lateral mono-insaturada de fórmula $C_8H_{15}O$.

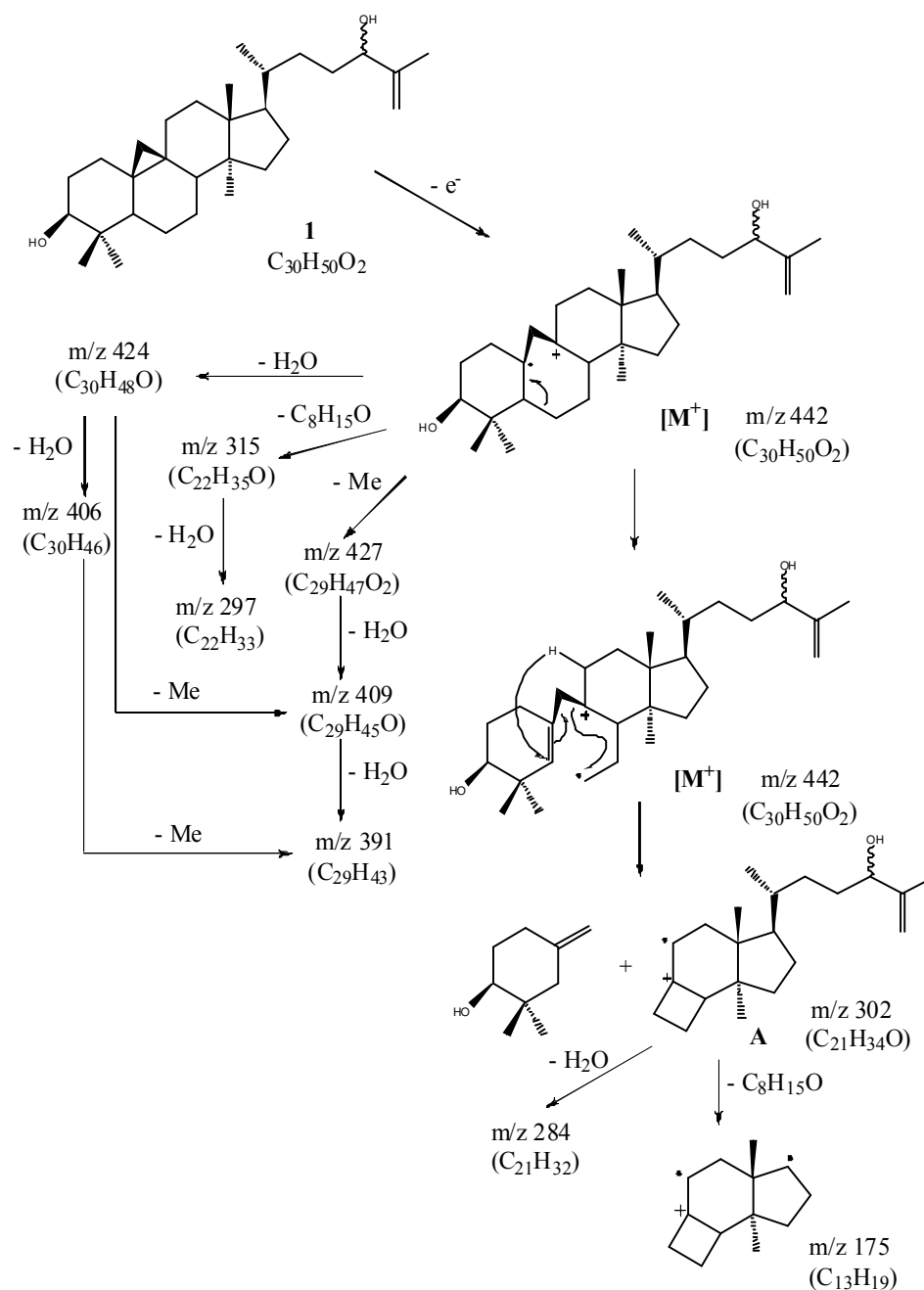


Figura 2.23 – Principais fragmentos originados pela clivagem do cicloart-25-eno-3β,24-diol.

Tabela 2.24 – Principais fragmentos originados pela clivagem do cicloart-25-eno-3 β ,24-diol e respectivas intensidades relativas.

Ião formado	m/z (% rel)
[M] ⁺	442 (4)
[M-CH ₃] ⁺	427 (5)
[M-H ₂ O] ⁺	424 (10)
[M-CH ₃ -H ₂ O] ⁺	409 (20)
[M-cadeia lateral] ⁺	315 (67)
[M-cadeia lateral-2H] ⁺	313 (5)
[Fragmento A] ⁺	302 (16)
[Fragmento A-cadeia lateral] ⁺	175 (48)
[Fragmento A-cadeia lateral-2H] ⁺	173 (35)

A comparação dos dados obtidos com os dados descritos na literatura possibilitou a identificação inequívoca do composto e a confirmação da atribuição dos sinais de ¹H-RMN e ¹³C-RMN (Della Greca *et al*, 1994).

Tabela 2.25 – Espectro de ¹H-RMN do cicloart-25-eno-3 β ,24-diol [CDCl₃, δ (ppm), *J* (Hz)].

Posição	¹ H
3	3,30 <i>dd</i> (4,4; 10,8)
18	0,98* <i>s</i>
19	0,35 <i>d</i> (4,0) 0,57 <i>d</i> (4,0)
21	0,90 <i>d</i> (6,8)
24	4,04 <i>t</i> (6,4)
26	1,74 <i>s</i>
27	4,85 <i>s</i> 4,95 <i>s</i>
28	0,91 <i>s</i>
29	0,98* <i>s</i>
30	0,83 <i>s</i>

* Sinais sobrepostos

Tabela 2.26 – Espectros de ^{13}C - RMN e DEPT do cicloart-25-eno-3 β ,24-diol [CDCl_3 , δ (ppm), J (Hz)].

Posição	^{13}C	^{13}C -DEPT
1	32,0**	CH_2
2	30,4	CH_2
3	78,8*	CH
4	40,5	C
5	47,1	CH
6	21,1	CH_2
7	28,2	CH_2
8	48,0	CH
9	20,0	C
10	26,0	C
11	26,1	CH_2
12	35,6	CH_2
13	45,3	C
14	48,8	C
15	32,9	CH_2
16	26,4	CH_2
17	52,2	CH
18	18,1	CH_3
19	29,9	CH_2
20	35,9	CH
21	18,3	CH_3
22	31,9**	CH_2
23	31,6	CH_2
24	78,8*	CH
25	147,8	C
26	17,2	CH_3
27	110,9	CH_2
28	19,3	CH_3
29	14,0	CH_3
30	25,4	CH_3

* Sinais sobrepostos; ** Atribuições permutáveis

2.1.3.3 *Cicloart-23-eno-3 β ,25-diol*

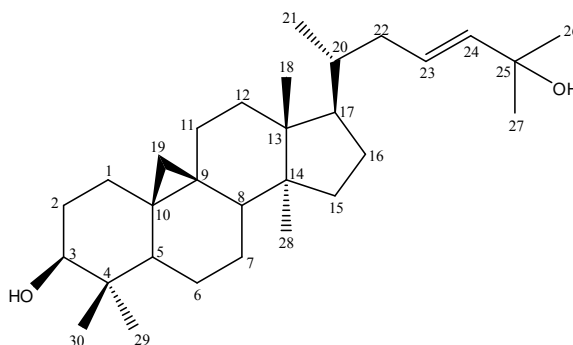


Figura 2.24 – Estrutura do composto cicloart-23-eno-3 β ,25-diol (**9**).

O composto **9** foi identificado como sendo o cicloart-23-eno-3 β , 25-diol, de fórmula molecular C₃₀H₅₀O₂, compatível com o ião molecular m/z 442 presente no espectro de massa.

O espectro de IV apresentou uma banda intensa e larga a 3350 cm⁻¹ característica da função hidroxilo.

O espectro de ¹H-RMN evidenciou a presença de um anel de ciclopropano exibindo, tal como o composto **8**, dois dupletos a campo particularmente alto (δ_H 0,57 e δ_H 0,35) (cf. Tabela 2.28). O sinal a δ_H 1,33, correspondente a dois grupos metilo, indicou a presença na cadeia lateral de um grupo 2-hidroxi-isopropilo. Este espectro revelou ainda a existência de quatro grupos metilo terciários adicionais, a δ_H 0,98 (com uma integração correspondente a dois grupos metilo), 0,90 e 0,83. O duplete observado a δ_H 0,88 ($J = 4,0$ Hz) indicou a presença de um único metilo secundário. Este espectro evidenciou ainda a existência de um grupo hidroxilo secundário, mediante a existência de um duplo duplete a δ_H 3,30 atribuível ao protão geminal ao grupo hidroxilo em C-3 ($J_{ac} = 4,0$ Hz; $J_{aa} = 12,0$ Hz), e a existência de uma dupla ligação com ambos os protões olefínicos a ressoar com desvios químicos muito próximos (δ_H 5,61 e 5,62).

Por sua vez, o espectro de ¹³C-RMN confirmou a existência de um grupo 2-hidroxi-isopropilo mostrando um sinal correspondente a um carbono quaternário ligado a um oxigénio a δ_C 70,8 (cf. Tabela 2.29). A presença de uma ligação dupla em C-23 foi suportada pelos sinais a δ_C 139,3 e δ_C 125,6 (Della Greca *et al*, 1994).

O espectro de massa apresentou um ião a m/z 302 confirmando a presença de um ciclopropano (cf. Figura 2.23) e os iões a m/z 315 [M-cadeia lateral]⁺ e a m/z 175 [Fragmento A-cadeia lateral]⁺ que localizam a ligação dupla e um dos grupos OH na cadeia lateral; ambos são consistentes com uma perda de 127 unidades de massa, que se coaduna com a existência de uma cadeia lateral mono-insaturada de fórmula C₈H₁₅O (cf. Tabela 2.27).

A confirmação última da estrutura do composto adveio de literatura prévia que permitiu confirmar e realizar atribuições de outro modo só passíveis de serem efectuadas mediante espectros de NMR bidimensionais (Della Greca *et al*, 1994).

Tabela 2.27 – Principais fragmentos originados pela clivagem do cicloart-23-eno-3 β ,25-diol e respectivas intensidades relativas.

Ião formado	m/z (% rel)
[M] ⁺	442 (1)
[M-CH ₃] ⁺	427 (1)
[M-H ₂ O] ⁺	424 (9)
[M-CH ₃ -H ₂ O] ⁺	409 (19)
[M-2H ₂ O] ⁺	406 (6)
[M-cadeia lateral] ⁺	315 (4)
[M-cadeia lateral-2H] ⁺	313 (8)
[Fragmento A] ⁺	302 (2)
[Fragmento A-cadeia lateral] ⁺	175 (28)
[Fragmento A-cadeia lateral-2H] ⁺	173 (32)

Tabela 2.28 – Espectros de ¹H-RMN do cicloart-23-eno-3 β ,25-diol [CDCl₃, δ (ppm), *J* (Hz)].

Posição	¹ H
3	3,30 <i>dd</i> (4,0; 12,0)
18	0,98* <i>s</i>
19	0,34 <i>d</i> (4,0) 0,56 <i>d</i> (4,0)
21	0,88 <i>d</i> (4,0)
23	5,61** <i>s</i>
24	5,62** <i>s</i>
26	1,33* <i>s</i>
27	1,33* <i>s</i>
28	0,90 <i>s</i>
29	0,98* <i>s</i>
30	0,83 <i>s</i>

* Sinais sobrepostos; ** Atribuições permutáveis

Tabela 2.29 – Espectros de ^{13}C -RMN e DEPT do cicloart-23-eno-3 β ,25-diol [CDCl_3 , δ (ppm), J (Hz)].

Posição	^{13}C	DEPT
1	32,0	CH_2
2	30,4	CH_2
3	78,8	CH
4	40,5	C
5	47,1	CH
6	21,1	CH_2
7	28,1	CH_2
8	48,0	CH
9	20,0	C
10	26,1 ^(a)	C
11	26,0 ^(a)	CH_2
12	35,6	CH_2
13	45,3	C
14	48,8	C
15	32,8	CH_2
16	26,4	CH_2
17	52,0	CH
18	18,1	CH_3
19	30,0	CH_2
20	36,4	CH
21	18,3	CH_3
22	39,0	CH_2
23	139,3	CH
24	125,6	CH
25	70,8	C
26	29,9	CH_3
27	29,9	CH_3
28	19,3	CH_3
29	14,0	CH_3
30	25,4	CH_3

Segundo a literatura, as atribuições assinaladas com ^(a) são inversas, ou seja, o sinal a δ_c 26,0 corresponde ao carbono C-10 e o sinal a δ_c 26,1 ao C-11; no entanto, o espectro de DEPT realizado elimina quaisquer dúvidas ao atribuir ao sinal a δ_c 26,0 carácter de CH_2 , sendo o carbono a δ_c 26,1 correspondente a um carbono quaternário.

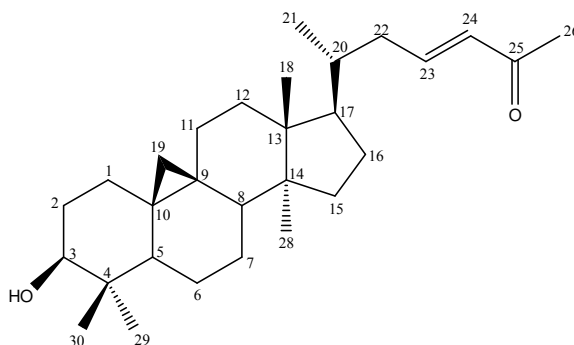
2.1.3.4 27-nor-3 β -hidroxicicloart-23-eno-25-ona

Figura 2.25 – Estrutura do composto 27-nor-3 β -hidroxicicloart-23-eno-25-ona (**10**).

O composto **10** foi identificado como sendo a 27-nor-3 β -hidroxicicloart-23-eno-25-ona, de fórmula molecular $C_{29}H_{46}O_2$, compatível com o íon molecular a m/z 426 presente no espectro de massa.

O espectro de 1H -RMN (cf. Tabela 2.31) evidenciou sinais com deslocamentos químicos semelhantes aos referidos para os compostos **8** e **9**, típicos do esqueleto do cicloartano com um grupo hidroxilo em C-3: os dois dupletos característicos dos prótons ciclopropílicos a δ_H 0,36 e δ_H 0,58; os sinais relativos aos grupos metilo terciários a δ_H 1,00, 0,99, 0,91 e 0,83 e ao grupo metilo secundário a δ_H 0,92 e o duplo duplete a δ_H 3,31 indicativo da existência de um hidroxilo secundário em C-3. No entanto, o aparecimento de um singlete integrável para três prótons a δ_H 2,28 indicou a existência de um grupo metil-cetona. Também neste caso os sinais correspondentes aos prótons olefínicos se encontram a campo substancialmente mais baixo (δ_H 6,82 e δ_H 6,10), indiciando a existência de uma cetona α,β -insaturada.

O espectro de ^{13}C -RMN (cf. Tabela 2.32) confirmou a existência de um grupo carbonilo conjugado (δ_C 198,7), com os carbonos olefínicos a ressoar a δ_C 147,8 e 132,6, e de um grupo hidroxilo secundário mediante a existência de um grupo metino a δ_C 78,8.

Por sua vez, o padrão de fragmentação em espectrometria de massa revelou-se semelhante ao apresentado pelos cicloartanos **8** e **9**, com íões proeminentes a m/z 411, 408, 393 e 286 (cf. Tabela 2.30).

Tabela 2.30 – Principais fragmentos originados pela clivagem do composto **10** e respectivas intensidades relativas.

Ião formado	m/z (% rel)
[M] ⁺	426 (1)
[M-CH ₃] ⁺	411 (1)
[M-H ₂ O] ⁺	408 (1)
[M-CH ₃ -H ₂ O] ⁺	393 (3)
[M-cadeia lateral] ⁺	315 (2)
[M-cadeia lateral-2H] ⁺	313 (3)
[Fragmento A] ⁺	286 (5)
[Fragmento A-cadeia lateral] ⁺	175 (26)
[Fragmento A-cadeia lateral-2H] ⁺	173 (24)

Este composto foi previamente isolado de outras espécies, o que possibilitou a comparação dos dados espectroscópicos obtidos e a confirmação da atribuição dos sinais de RMN (Parveen *et al*, 1991; Cabrera *et al*, 1997).

Tabela 2.31 – Espectro de ¹H-RMN do composto **10** [CDCl₃, δ (ppm), J (Hz)].

Posição	¹ H
3	3,31 <i>dd</i> (4,8; 10,8)
18	1,00 <i>s</i>
19	0,36 <i>d</i> (4,4) 0,58 <i>d</i> (4,4)
21	0,92* <i>d</i> (6,0)
22	2,40 <i>dd</i> (6,4; 14,8)
23	6,82 <i>ddd</i> (6,4; 8,8; 16,0)
24	6,10 <i>d</i> (16,0)
26	2,28 <i>s</i>
28	0,91* <i>s</i>
29	0,99 <i>s</i>
30	0,83 <i>s</i>

* Sinais sobrepostos

Tabela 2.32 – Espectros de ^{13}C -RMN e ^{13}C -DEPT do composto **10** [CDCl_3 , δ (ppm), J (Hz)].

Posição	^{13}C	DEPT
1	32,0	CH_2
2	30,4	CH_2
3	78,8	CH
4	40,5	C
5	47,1	CH
6	21,1	CH_2
7	26,0	CH_2
8	48,0	CH
9	19,9	C
10	26,1	C
11	26,4	CH_2
12	32,8	CH_2
13	45,4	C
14	48,9	C
15	35,5	CH_2
16	28,2	CH_2
17	52,2	CH
18	18,1	CH_3
19	29,9	CH_2
20	36,2	CH
21	18,6	CH_3
22	39,6	CH_2
23	147,8	CH
24	132,6	CH
25	198,7	C
26	26,9	CH_3
28	19,3	CH_3
29	25,4	CH_3
30	14,0	CH_3

2.1.4 *p*-Hidroxibenzaldeído

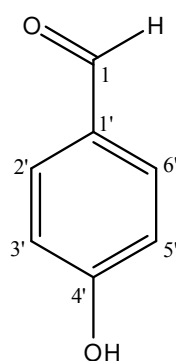


Figura 2.26 – Estrutura do *p*-hidroxibenzaldeído (**11**).

Ao composto **11** foi atribuída a estrutura do *p*-hidroxibenzaldeído. Este composto encontra-se extensamente distribuído por uma vasta variedade de plantas (Merck, 2006). Pode existir sob forma livre ou combinado com variados glicósidos (Chapman & Hall, 1994).

O íão a m/z 146 $[M+1+Na]^+$ no espectro de ESI-MS do composto é concordante com a fórmula molecular $C_7H_6O_2$. Por sua vez, o espectro de infravermelho do composto apresentou uma banda larga a 3448 cm^{-1} característica de grupos hidroxilo envolvidos em ligações intermoleculares, ao contrário do que aconteceria para o seu homólogo *orto*. Efectivamente, a posição *orto* do hidroxilo no anel benzénico permitiria a ocorrência de pontes de hidrogénio intramoleculares, tornando a banda significativamente mais estreita. Este espectro evidenciou ainda a existência da função carbonilo, perante a existência de uma banda intensa a 1705 cm^{-1} .

A simplicidade do seu perfil de RMN obviou a análise, tendo sido realizados apenas os espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN (cf. Tabela 2.33). O espectro de ^1H -RMN apresentou um singlete altamente desblindado, a δ_{H} 9,89, que comprovou a existência de uma função aldeído. Além disso, este espectro apresentou o perfil característico de um benzeno *para*-dissubstituído: dois dupletos a integrar para dois prótons cada, com constantes de acoplamento características de prótons em *orto* ($J \approx 8\text{ Hz}$). Por sua vez, no espectro de ^{13}C -RMN, o desvio químico do carbono carbonílico do aldeído evidenciou um efeito diamagnético resultante da conjugação com o anel aromático (cf. Tabela 2.33). Efectivamente, o sinal encontrado (δ_{C} 191,0), é bastante inferior ao intervalo de ressonância expectável para os aldeídos (δ_{C} 200 - 220) (Silverstein *et al*, 1998). Conforme se pode verificar pela observação dos desvios químicos correspondentes, os carbonos C-2' e C-6' (δ_{C} 132,4) ressoam a campos mais baixos que C-3' e C-5' (δ_{C} 115,9). Este efeito de desblindagem de C-2' e C-6' clarifica-se mediante a análise da Figura 2.27.

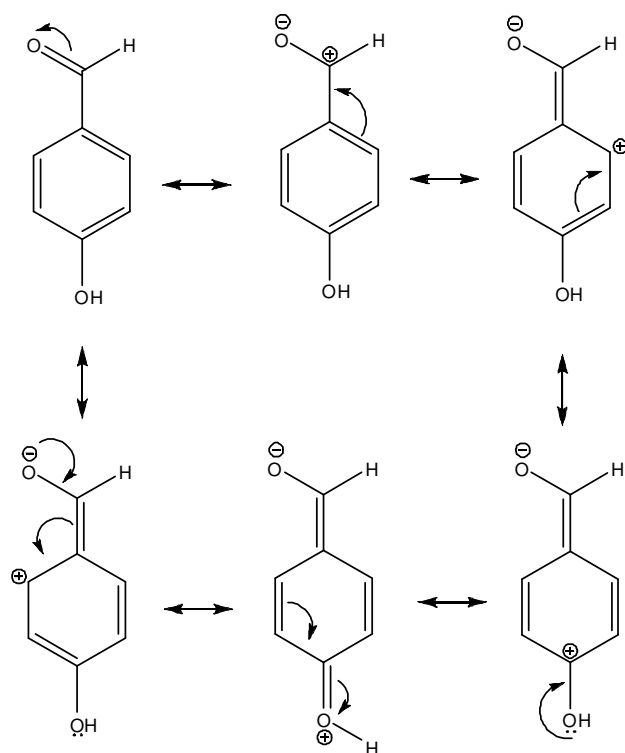


Figura 2.27 – Conjugação do carbono carbonílico do *p*-hidroxibenzaldeído com o anel aromático.

A comparação com espectros disponíveis numa base de dados (SDBS, 2007) permitiu a confirmação da identidade do composto.

Tabela 2.33 – Espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN do *p*-hidroxibenzaldeído [CDCl_3 , δ (ppm), J (Hz)].

Posição	^1H -RMN	^{13}C -RMN
1	9,89 <i>s</i>	191,0
1'	-	130,0
2'	7,84 <i>d</i> (8,8)	132,4
3'	6,98 <i>d</i> (8,4)	115,9
4'	6,08 <i>s</i> (OH)	161,3
5'	6,98 <i>d</i> (8,4)	115,9
6'	7,84 <i>d</i> (8,8)	132,4

2.2 Ensaios biológicos

2.2.1 Modulação da multirresistência em células de linfoma de rato

Um dos ensaios utilizados para a avaliação da capacidade moduladora da MDR é o ensaio de exclusão da rodamina 123. A rodamina 123 é um substrato fluorescente da Pgp pelo que a actividade da Pgp será inversamente proporcional ao aumento de fluorescência no interior da célula e, consequentemente, a capacidade moduladora do inibidor será directamente proporcional a esta fluorescência.

Também nesta dissertação se recorreu ao método da acumulação intracelular da rodamina 123, mensurável através da técnica de citometria de fluxo. A passagem de um feixe laser através de células origina a sua dispersão. A análise da dispersão da luz providencia informação sobre o tamanho e estrutura celular. Os parâmetros analisados são FSC (*forward scatter*), SSC (*side scatter*) e FL-1 (intensidade da fluorescência). O parâmetro designado por FSC (cf. Figura 2.28) corresponde à dispersão da luz incidente sobre as células com um ângulo menor que 90° e o seu valor está associado ao diâmetro celular: fragmentos celulares e células mortas exibem valores de FSC menores que células vivas. Por sua vez, SSC (cf. Figura 2.28) corresponde à dispersão da luz incidente sobre as células com um ângulo de 90° e está associado à granulometria celular, refractividade e presença de estruturas intracelulares com capacidade reflectora da luz; neste caso, células mortas exibem valores de SSC superiores aos das células vivas (Darzynkiewicz, 1996).

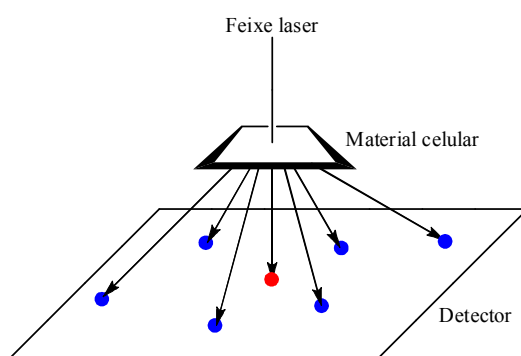


Figura 2.28 – Representação esquemática dos parâmetros FSC(●) e SSC (●).

Finalmente, o valor de intensidade da fluorescência média (FL-1) é o último dos parâmetros instrumentais e consiste na percentagem de fluorescência apresentada pelas células parentais (PAR) e transfectadas com o gene MDR-1 humano (MDR), relativamente às respectivas

células não tratadas. A razão da actividade de fluorescência (FAR) é calculada com base nos valores de FL-1, de acordo com a seguinte fórmula (Duarte *et al*, 2007):

$$FAR = \frac{\left[\frac{(FL-1)_{MDR+composto}}{(FL-1)_{MDR\ controla}} \right]}{\left[\frac{(FL-1)_{Parental+composto}}{(FL-1)_{Parental\ controla}} \right]} \quad (1)$$

Todos os diterpenos isolados neste trabalho foram sujeitos a este ensaio. As suas estruturas encontram-se reproduzidas na Figura 2.29.

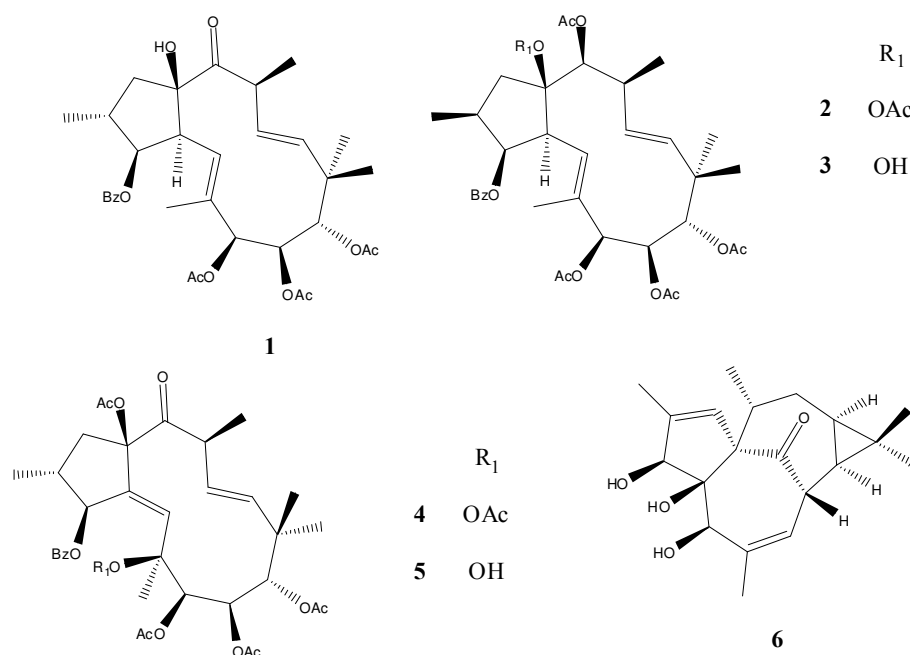


Figura 2.29 – Diterpenos sujeitos ao ensaio de acumulação da rodamina 123.

Segundo os resultados reproduzidos na Tabela 2.34, todos os compostos testados demonstraram a capacidade de aumentar a acumulação intracelular da rodamina (FAR > 1,10 a 4 µg/ml), sendo o efeito dose-dependente e muito intenso na concentração de 40 µg/ml.

O composto **2** revelou ser o mais activo (FAR = 12,4 a 4 µg/ml) aumentando a acumulação da rodamina mediante a inibição da Pgp de um factor de, aproximadamente, cinco vezes o do controlo positivo verapamil (FAR = 2,7 a 10 µg/ml).

Tabela 2.34 – Resultados do ensaio da acumulação intracelular da rodamina 123.

Composto	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	FSC ^a	SSC ^a	FL-1 ^a	FAR ^a
PAR+R123 ^(b)	-	447,4	178,1	1029,7	-
PAR+R123 ^(b)	-	437,6	177,5	998,3	-
MDR+R123 ^(c)	-	486,2	256,8	5,7	-
1	4	470,6	237,6	14,8	2,9
	40	468,4	224,7	375,4	72,9
2	4	470,6	221,7	64,1	12,4
	40	465,6	211,8	439,0	82,2
3	4	470,8	224,5	7,0	1,4
	40	458,8	208,4	186,0	36,1
4	4	477,3	227,5	10,2	2,0
	40	460,3	217,2	464,3	90,2
5	4	490,2	213,6	7,2	1,4
	40	476,1	206,8	223,4	43,4
6	4	493,1	232,1	12,8	2,5
	40	515,4	205,5	456,1	88,6
Verapamil	10	495,9	251,1	14,1	2,7
DMSO	20 μl	469,1	205,9	5,0	1,0

(a) FSC- *forward scatter*; SSC – *side scatter*; FL-1- Intensidade de fluorescência média; FAR – razão da actividade de fluorescência (calculado pela fórmula (1)); (b) Células parentais sem o gene MDR; (c) Células parentais transfectadas com o gene MDR]

A comparação da actividade moduladora da MDR dos pares de compostos **2/3** e **4/5**, que diferem apenas no substituinte em C-15 e C-6, respectivamente, sugere para ambos os casos a existência de correlação entre a lipofilia, mensurável pelo coeficiente de partilha octanol/água ($\log P$), e a capacidade moduladora da MDR, enfatizando consequentemente a importância deste parâmetro físico-químico na actividade (cf. Tabela 2.35).

Tabela 2.35 – Correlação entre a actividade anti-MDR e as propriedades físico-químicas dos compostos **1 – 6** (número de dadores e aceptadores de ligações de hidrogénio, peso molecular e coeficiente de partilha octanol/água). ^(a)

Composto	FAR		Número de ligações de H		PM	Log <i>P</i>
	4 $\mu\text{g/ml}$	40 $\mu\text{g/ml}$	Aceptadores	Dadores		
1	2,9	72,9	10	1	589	4,98
2	12,4	82,2	12	0	684	5,12
3	1,4	36,1	11	1	642	4,41
4	2,0	90,2	13	0	698	5,21
5	1,4	43,4	12	1	656	4,51
6	2,5	88,6	4	3	332	2,46

(a) Os parâmetros físico-químicos foram determinados usando o programa “JME molecular editor” (versão Novembro de 2007, www.molinspiration.com/).

No entanto, a disparidade da capacidade moduladora entre os compostos **2** e **3** e entre **4** e **5** leva a concluir que, principalmente no primeiro caso, deverão estar envolvidos outros factores.

Efectivamente, a existência de um grupo acetilo em C-15, aceitador de ligações de hidrogénio, parece ser determinante para a actividade do composto **2**. A diferença de actividade entre o par **2/3** (Ac/OH, respectivamente) poderá também ser devida a possíveis alterações conformacionais induzidas pela alteração do substituinte em C-15.

Conforme se pode verificar na Tabela 2.35, os jatrofanos testados além de um elevado valor de $\log P$ (4,41 – 5,21), apresentam também um grande número de grupos aceitadores de pontes de hidrogénio realçando igualmente a importância deste parâmetro na actividade. A análise dos resultados obtidos para o composto **6** corrobora estas conclusões; com efeito, o referido composto, embora com um $\log P$ muito inferior aos valores apresentados pelos jatrofanos **1** – **5**, apresenta a possibilidade de formar sete ligações de hidrogénio (quatro como aceitador e três como dador).

2.2.2 Actividade anti-proliferativa

Os resultados obtidos nos ensaios de actividade anti-proliferativa encontram-se compilados na Tabela 2.36.

Tabela 2.36 – Resultados do ensaio de actividade antiproliferativa.

Composto	ID ₅₀ µg/ml PAR ^(a) L5178	ID ₅₀ µg/ml MDR ^(b) L5178
1	22,4	11,9
2	13,1	9,3
3	21,1	13,7
4	23,8	12,7
5	18,0	9,2
6	25,9	13,8

(a) Células parentais sem o gene MDR; (b) Células parentais transfectadas com o gene MDR

A actividade dos compostos foi expressa em termos de ID₅₀, a concentração de composto à qual se verifica uma inibição de 50% do crescimento celular. Verificou-se que para todos os compostos o valor de ID₅₀ é menor para as células transfectadas com o gene MDR. O composto que apresentou um maior efeito anti-proliferativo foi o jatrofano **5** (9,16 µg/ml).

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Equipamentos e técnicas gerais

3.1.1 Equipamento e técnicas de caracterização/identificação estrutural

Os pontos de fusão foram determinados num aparelho de Koppfler e não estão corrigidos.

As rotações específicas, $[\alpha]_D^{20}$, foram determinadas num polarímetro Perkin-Elmer 241-MC, mediante a dissolução das amostras em clorofórmio (Merck, ref^a 2447) ou metanol e a utilização de uma célula com 1 dm de comprimento.

Os espectros de Infra-vermelho foram traçados num espectrofotómetro Nicolet Impact 400, com Transformada de Fourier, sob a forma de filme entre células de cloreto de sódio (NaCl).

Para obter os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) recorreu-se a um espectrómetro Bruker ARX-400 (^1H RMN 400 MHz; ^{13}C RMN 100,61 MHz). Como solventes, foram utilizados o CDCl_3 (Aldrich, ref^a 17, 593-5) e o MeOD.

Os espectros de Massa foram realizados num aparelho Kratos MS25RF, tendo sido aplicadas as técnicas de ionização por impacto electrónico com injeção directa da amostra a 70 eV e de bombardeamento de átomos rápidos (FAB).

Os espectros de ESI-MS foram obtidos num aparelho Quattro Micro API, Micromass, Waters utilizando a técnica ESI positivo (Electrospray Ionisation Mass).

3.1.2 Técnicas de separação cromatográfica

O extracto total e fracções subsequentes foram analisados por cromatografia em coluna. Utilizaram-se como fase estacionária sílica-gel (Merck, ref^a 9385) e como fase móvel várias misturas de solventes, dependendo das características da amostra e da polaridade pretendida.

As fracções obtidas foram associadas após controlo por cromatografia em camada fina, utilizando placas pré-preparadas de sílica-gel (Merck 60F₂₅₄) eluídas com diversos eluentes, de acordo com as características da amostra em análise. Após eluição, as placas foram pulverizadas com uma mistura de H₂SO₄: MeOH (1:1) e reveladas por acção do calor, tendo sido visualizadas por exposição à luz UV a 254 e 366 nm, antes e depois da aplicação dos agentes reveladores.

A cromatografia preparativa foi realizada em placas pré-preparadas de sílica-gel, de dimensões 20×20 cm com 0,5 mm de espessura (Merck 60 GF₂₅₄) ou em placas preparadas manualmente no laboratório mediante a dissolução de 60 g de sílica-gel (Merck, ref^a 7730) em 130 ml de água por cada 5 placas, sua posterior distribuição ao longo de placas de vidro de dimensões 20×20 cm com 4 mm de espessura, secagem ao ar e activação na estufa a 120°C durante 1h. A sua eluição e detecção foi efectuada de modo análogo ao referido anteriormente para a cromatografia em camada fina.

Para a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) recorreu-se a um cromatógrafo equipado com uma bomba Merck-Hitachi L-7100, detector de UV Spectra Chrom 100 e integrador Merck-Hitachi D-7500. Como fase móvel, utilizaram-se misturas em diversas proporções de MeOH:H₂O previamente desgaseificados. As condições ideais de separação foram analisadas por HPLC analítico, recorrendo a uma coluna Lichrospher[®] 100 RP-18 5μ, 125×4mm, Merck, com um fluxo de 1 ml/min e um volume de injeção de 20μl da amostra previamente dissolvida em metanol. O posterior isolamento dos compostos foi efectuada numa coluna Lichrospher[®] 100 RP-18, 250×10mm, Merck, com um fluxo de 4 ml/min e um volume de injeção de 200 μl da amostra previamente dissolvida em metanol. A evaporação dos solventes foi efectuada a pressão reduzida, a uma temperatura entre 40 e 50°C.

3.2 Estudo fitoquímico da *Euphorbia mellifera* Ait.

A espécie *Euphorbia mellifera* Ait. sob análise é proveniente do Jardim Garcia da Horta (partes aéreas). A sua identificação foi levada a cabo pela Dra. Teresa Vasconcelos do Instituto Superior de Agronomia, encontrando-se um exemplar depositado no herbário da mesma instituição.

3.2.1 Processo extractivo

A planta foi seca e pulverizada, tendo-se obtido 2,5 Kg de um pó grosseiro. Este pó foi sujeito a extracções sucessivas com metanol ($11 \times 11,5$ L), com agitação e à temperatura ambiente. À medida que iam sendo obtidos, os extractos foram filtrados para eliminação de partículas sólidas e concentrados em evaporador rotativo. A associação dos vários extractos resultou em 500 g de extracto bruto.

O extracto bruto foi dissolvido em álcool etílico a 96% (2,7 L) ao qual foi adicionado igual volume de uma solução aquosa de acetato de chumbo a 3 %. Após repouso durante 4 h, procedeu-se à filtração desta solução a vácuo através de celite. Este procedimento encontra-se descrito em (Appendino *et al*, 1999a) e tem como objectivo a eliminação das ceras existentes na planta por precipitação com o chumbo e sua posterior eliminação através da filtração. A solução hidro-alcoólica desta forma obtida foi sujeita a evaporação a pressão reduzida de modo a eliminar o álcool. Seguiu-se a extracção líquido-líquido da solução aquosa resultante com AcOEt (16 L). Os extractos de AcOEt foram posteriormente associados e secos mediante dois processos: extracção com uma solução aquosa saturada de cloreto de sódio (*salting out*) e secagem com sulfato de sódio anidro. Após evaporação do solvente, obteve-se um resíduo de 44 g (cf. Figura 3.1).

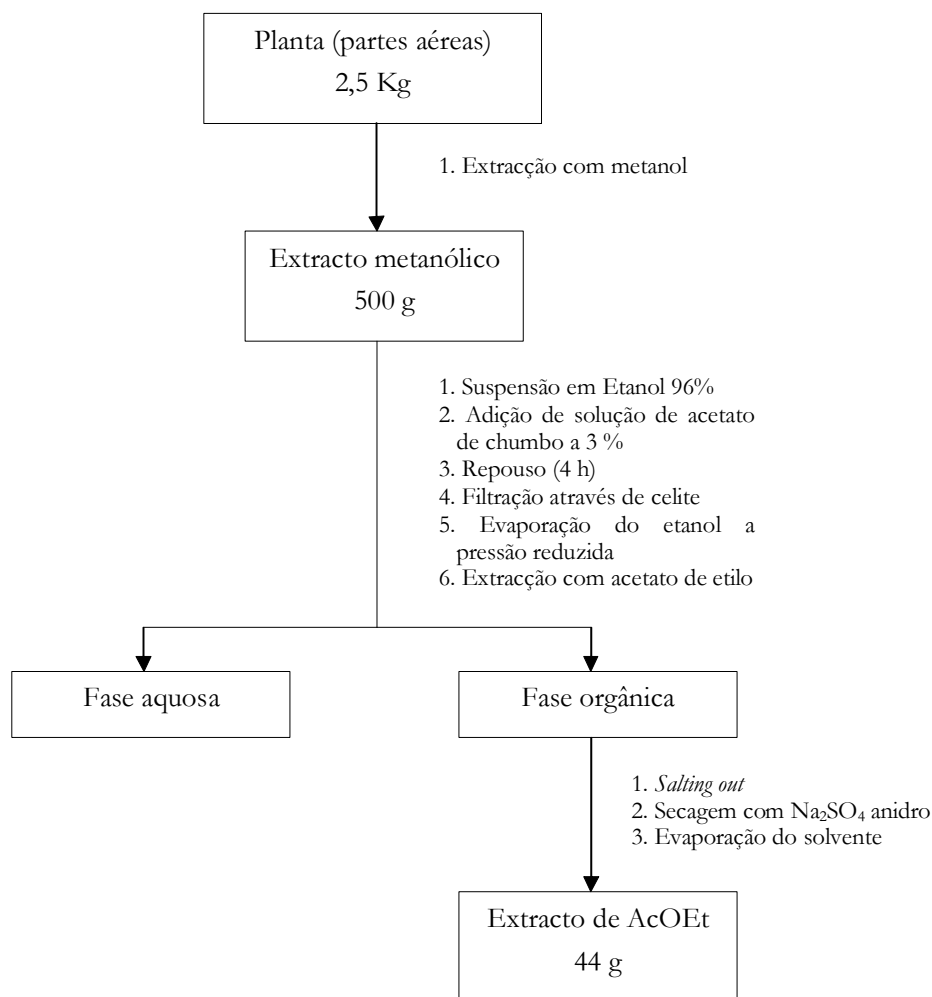


Figura 3.1 – Representação esquemática da metodologia utilizada para a obtenção do extracto de AcOEt de *Euphorbia mellifera*.

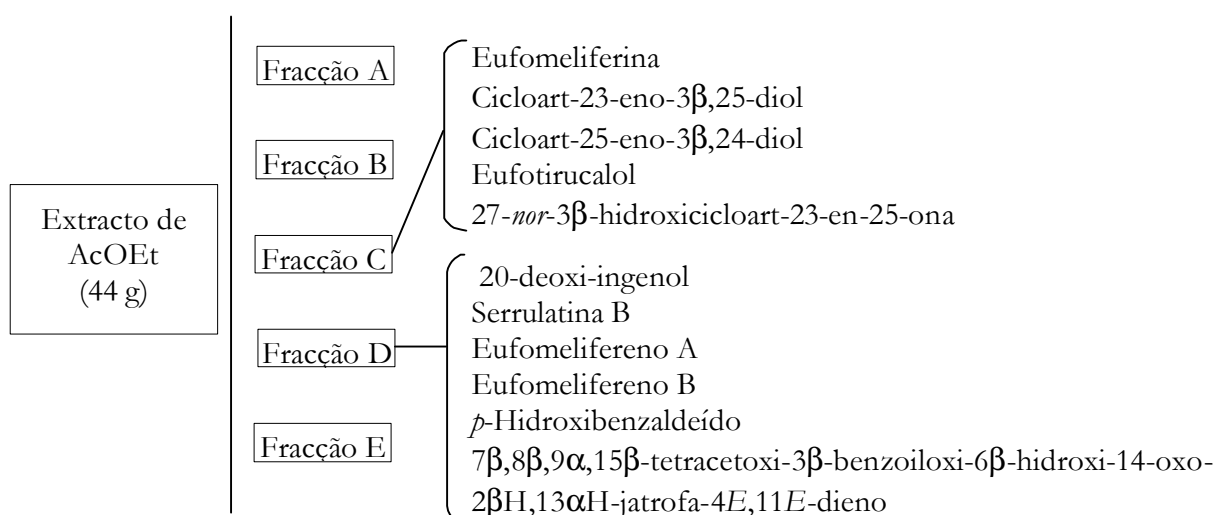
3.2.2 Fraccionamento do extracto de AcOEt

O extracto de AcOEt (44 g) foi fraccionado por cromatografia em coluna, utilizando 750 g de sílica-gel como fase estacionária e misturas de n-hexano: AcOEt e AcOEt: MeOH de polaridade crescente como fase móvel. Os eluídos recolhidos de, aproximadamente, 200 ml foram posteriormente associados conforme reproduzido na Tabela 3.1, após controlo por cromatografia em camada fina.

Tabela 3.1 – Fraccionamento do extracto de AcOEt.

Fracção	Massa (g)	Eluente (V/V)	Volume (L)
A (9-11)	0,74	Hex:AcOEt (95:5)	0,5
B (12-20)	0,86	Hex: AcOEt (90:10 a 85:15)	2,0
C (21-32)	3,65	Hex:AcOEt (85:15 a 75:25)	2,0
D (33-37)	4,21	Hex:AcOEt (75:25 a 70:30)	1,0
E (38-47)	2,70	Hex:AcOEt (70:30 a 65:35)	2,0
F (48-72)	4,26	Hex:AcOEt (60:40 a 50:50)	4,5
G (73-120)	3,72	Hex:AcOEt (50:50 a 0:100)	8,5
H (121-125)	5,33	AcOEt:MeOH (95:5)	0,5
I (126-128)	7,74	AcOEt:MeOH (90:10)	0,5
J (129-142)	8,44	AcOEt:MeOH (90:10)	2,5
K (143-167)	6,04	AcOEt:MeOH (90:10 a 50:50)	4,5
L (168-final)	8,65	AcOEt:MeOH (50:50 a 0:100)	4,5

Das fracções obtidas, apenas foi possível estudar as fracções A-E, das quais se isolaram 11 compostos (cf. Figura 3.2):

**Figura 3.2** – Representação esquemática das fracções analisadas e respectivos compostos puros obtidos.

3.2.3 Estudo da fracção A

A fracção A (cf. Tabela 3.1) foi fraccionada por cromatografia em coluna, utilizando como fase estacionária 65 g de sílica e como fase móvel misturas de n-hexano:CH₂Cl₂ com polaridade crescente (100:0 a 85:15, gradiente 2,5%, volume total de eluente 5L; 50:50, 0,6L; 0:100, 0,1L; AcOEt 0,1L). Os eluídos recolhidos rondaram os 30 ml e foram associados num total de 6 fracções, das quais apenas uma, A4, apresentava um perfil cromatográfico justificativo de uma análise mais profunda. Esta fracção (215 mg, n-hexano: CH₂Cl₂, 85:15) foi, conseqüentemente, sujeita a cromatografia preparativa (3 × n-hexano:CH₂Cl₂, 1:1) originando uma mistura de compostos que se veio a comprovar por RMN consistirem em ftalatos, contaminantes comuns do metanol não destilado.

3.2.4 Estudo da fracção B

O estudo da fracção B (cf. Tabela 3.1) iniciou-se com a cromatografia em coluna do seu resíduo. Para tal, usou-se sílica gel (70 g) e misturas de n-hexano:CH₂Cl₂ (50:50 a 0:100, gradiente 5%, volume total de eluente 1,4 L) e CH₂Cl₂:AcOEt (90:10, 50:50 e 0:100, volume total de cada eluente 100 ml). Da associação dos eluídos de, aproximadamente, 30 ml resultaram 5 fracções, das quais apenas uma foi estudada. Verificou-se que a fracção B4 resultante apresentava facilidade de cristalização pelo que foi sujeita a uma recristalização em n-hexano. Os cristais formados em quantidade reduzida (2 mg) revelaram por RMN tratar-se de um triterpeno ainda bastante impuro, o que desencorajou a continuação da sua purificação.

3.2.5 Estudo da fracção C

A fracção C (cf. Tabela 3.1) foi cromatografada numa coluna preparada com 228 g de sílica gel, com misturas de eluentes de n-hexano:AcOEt de polaridades crescentes (100:0 a 60:40, gradiente 5%, volume total de eluente 6,2L; 50:50, 0,2L; 0:100, 0,2L; AcOEt:MeOH, 50:50, 0,4L e MeOH, 0,2L). Os eluídos recolhidos apresentavam um volume aproximado de 70 ml e foram associados em 6 fracções, após comparação do seu perfil cromatográfico por TLC. Destas 6 fracções, apenas duas delas, C3 e C4, apresentavam um perfil cromatográfico com interesse pelo que apenas estas foram analisadas.

A fracção C3 foi fraccionada segundo o esquema representado na Figura 3.3.

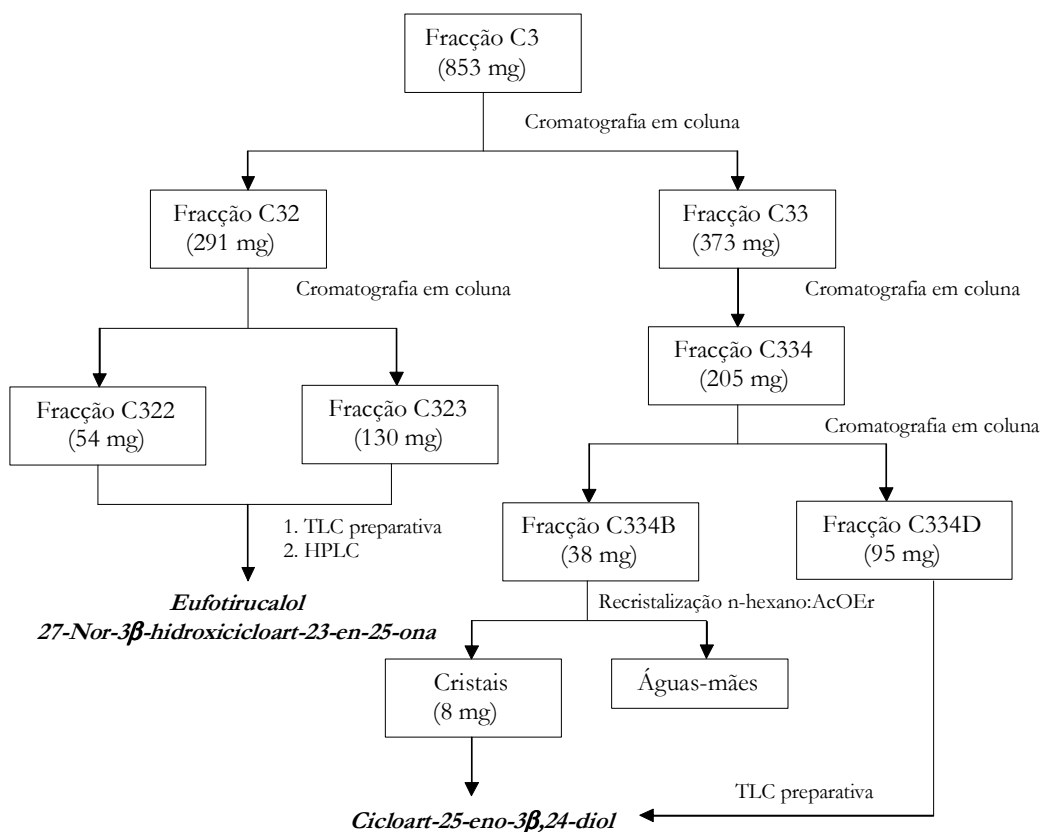


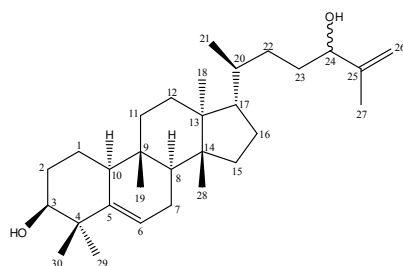
Figura 3.3 – Representação esquemática do estudo da fracção C3.

A fracção C3 foi fraccionada por cromatografia em coluna de sílica gel (86 mg) utilizando, como eluentes, misturas de n-hexano:CH₂Cl₂ (100:0 a 5:95, gradiente 5%, volume de cada eluente: 100 ml; 0:100, 0,7 L) e CH₂Cl₂:AcOEt (90:10 a 0:100, gradiente 10%, volume de cada eluente 100 ml; AcOEt:MeOH, 50:50 e 0:100, volume de cada eluente 100 ml). A posterior associação dos eluídos (40 ml) resultou em 3 fracções, das quais foram estudadas C32 e C33.

Para analisar a fracção C32 (291 mg, CH₂Cl₂: AcOEt, 100:0 a 70:30) recorreu-se a cromatografia em coluna com sílica-gel (30 g) utilizando como fases móveis misturas de n-hexano:CH₂Cl₂ (100:0 a 10:90, gradiente 10%, volume de cada eluente 100 ml) e CH₂Cl₂:AcOEt (100:0, 0,2 L; 99:1, 0,8 L; 97,5:2,5, 0,1 L; 95:5 a 75:25, gradiente 5%, volume total de eluente 0,6 L; 50:50, 0,1 L; 0:100, 0,1 L; AcOEt:MeOH, 50:50 e 0:100, 100 ml de cada eluente). Os eluídos resultantes de, aproximadamente, 30 ml foram associados em 3 fracções, duas das quais foram analisadas. Ambas as fracções C322 (54 mg, CH₂Cl₂:AcOEt, 99:1 a 97,5:2,5) e C323 (130 mg, CH₂Cl₂:AcOEt, 97,5:2,5 a 80:20) foram sujeitas a cromatografia preparativa em camada fina (11 placas, CHCl₃: MeOH, 97,5:2,5). Uma vez que esta tentativa de purificação saiu lograda, recorreu-se a HPLC com MeOH:H₂O a 90:10 (254 nm, 4

ml/min), possibilitando o isolamento de 11 mg de um triterpeno novo ao qual se atribuiu o nome eufotirucalol e a estrutura 19(10→9)-abeo-8 α ,9 β ,10 α -tirucal-5,25-dien-3 β ,24-diol. Para um outro pico que com este último sistema de eluentes apresentava um “shoulder” e não era, consequentemente, passível de purificação, optou-se pelo sistema MeOH:H₂O a 85:15. Este sistema de eluentes já permitiu o isolamento de 8 mg de 27-nor-3 β -hidroxicicloart-23-en-25-ona.

Eufotirucalol - 19(10→9)-abeo-8 α ,9 β ,10 α -tirucal-5,25-dien-3 β ,24-diol



Composto amorfo branco.

$$[\alpha]_D^{25} = + 2^\circ \text{ (c 0,173, CHCl}_3\text{)}$$

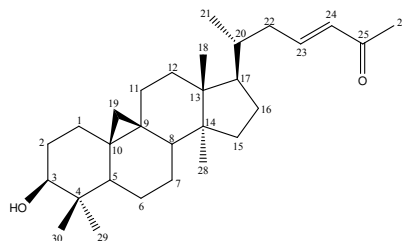
¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 5,65 (*d*, *J* = 5,6 Hz, H-6), 4,94 (*bs*, H-26), 4,86 (*bs*, H-26), 4,04 (*t*, *J* = 6,4 Hz, 24-CH₂OH), 3,50 (*bs*, 3-CH₂OH), 1,74 (*s*, Me-27), 1,16 (*s*, Me-30), 1,07 (*s*, Me-29), 0,93 (*d*, *J* = 6 Hz, Me-21), 0,88 (*s*, Me-28), 0,86 (*s*, Me-19), 0,83 (*s*, Me-18).

¹³C RMN (100,61 MHz, CDCl₃): δ 147,5 (C-25), 142,0 (C-5), 121,8 (C-6), 111,5 (C-26*), 111,0 (C-26*), 76,7 (C-3), 76,4 (C-24), 50,4 (C-17), 49,4 (C-10), 47,4 (C-14), 46,1 (C-13), 44,5 (C-8), 40,9 (C-4), 35,8 (C-20), 35,7 (C-11), 35,1 (C-9), 34,2 (C-15), 32,0 (C-23), 31,4 (C-22), 30,2 (C-12), 29,0 (C-29), 28,2 (C-16), 27,9 (C-2), 25,6 (C-30), 25,2 (C-7), 18,9** (C-28), 18,8 (C-1), 18,7** (C-21), 17,6 (C-27), 16,5 (C-19), 15,2 (C-18).

* Epímeros

** Atribuições permutáveis

EIMS, m/z (int.rel): 442 [M]⁺ (2), 290 (27), 275 (10), 163 (59), 161 (32), 152 (14), 134 (79).

27-nor-3 β -hidroxicicloart-23-en-25-ona

Composto amorfo branco.

$[\alpha]_D^{25} = +13^\circ$ (c 0,147, CHCl_3); Lit. $[\alpha]_D^{20} = +32,5^\circ$ (c 0,24, MeOH) (Parveen *et al*, 1991))

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 6,82 (*ddd*, $J = 6,4$; 8,8 e 16,0, H-23), 6,10 (*d*, $J = 16,0$ Hz, H-24), 3,31 (*dd*, $J = 4,8$ e 10,8 Hz, H-3), 2,40 (*dd*, $J = 6,4$ e 14,8 Hz, H-22), 2,28 (*s*, Me-26), 1,00 (*s*, Me-18), 0,99 (*s*, Me-29), 0,92* (*d*, $J = 6$ Hz, Me-21), 0,91* (*s*, Me-28), 0,83 (*s*, Me-30), 0,58 (*d*, $J = 4,4$ Hz, H-19), 0,36 (*d*, $J = 4,4$ Hz, H-19).

* Sinais sobrepostos

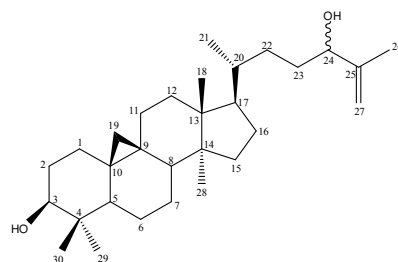
^{13}C RMN (100,61 MHz, CDCl_3): δ 198,7 (C-25), 147,8 (C-23), 132,6 (C-24), 78,8 (C-3), 52,2 (C-17), 48,9 (C-14), 48,0 (C-8), 47,1 (C-5), 45,4 (C-13), 40,5 (C-4), 39,6 (C-22), 36,2 (C-20), 35,5 (C-15), 32,8 (C-12), 32,0 (C-1), 30,4 (C-2), 29,9 (C-19), 28,2 (C-16), 26,9 (C-26), 26,4 (C-11), 26,1 (C-10), 26,0 (C-7), 25,4 (C-29), 21,1 (C-6), 19,9 (C-9), 19,3 (C-28), 18,6 (C-21), 18,1 (C-18), 14,0 (C-30).

EIMS, m/z (int.rel): 426 $[\text{M}]^+$ (1), 411 (1), 408 (1), 393 (3), 315 (2), 313 (3), 286 (5), 175 (26), 173 (24).

A fracção C33 (373 mg; CH_2Cl_2 :AcOEt, 70:30 a 10:90) foi re-cromatografada em coluna. O sistema de eluentes foi agora n-hexano:AcOEt (100:0 a 80:20, gradiente 2,5%, volume total de eluente 1,5L; 50:50, 100 ml; AcOEt:MeOH, 100:0 a 0:100, gradiente 50%, volume total de eluente 0,2L) e a quantidade de sílica utilizada de 38 g. O volume dos eluídos rondou os 30 ml. Uma das fracções resultantes, C334 (205 mg, n-hexano:AcOEt, 80:20), apresentou uma mancha com uma significativa absorção a 254 nm e coloração acastanhada após revelação. A possibilidade de se tratar de um diterpeno conduziu este estudo no sentido de a isolar. As quantidades ainda significativas do seu resíduo obrigaram ao seu fraccionamento novamente por cromatografia em coluna, com 16 g de sílica e utilizando como eluentes misturas de polaridades crescentes de n-hexano: CH_2Cl_2 (100:0 a 90:10, gradiente 2,5%, volume de cada eluente 50 ml; 85:15 a 20:80, gradiente 5%, volume de cada eluente 50 ml; 10:90, 50 ml; 0:100, 50 ml) e CH_2Cl_2 :AcOEt (97,5:2,5 a 90:10, gradiente 2,5 %, volume total de eluente 0,4 L; 50:50, 50 ml; 0:100, 50 ml; AcOEt:MeOH, 50:50, 50 ml e 0:100, 50 ml). A recolha e posterior associação dos eluídos de, aproximadamente, 20 ml, originou 4 fracções. A fracção C334B

(38 mg, CH₂Cl₂:AcOEt, 92,5:7,5) cristalizou do solvente de eluição pelo que foi sujeita a sucessivas recristalizações em n-hexano:AcOEt. O composto cristalino branco resultante (8 mg) encontrava-se puro, tendo sido posteriormente identificado como o cicloart-25-eno-3 β ,24-diol. Este triterpeno foi novamente isolado a partir da fracção C334D (95 mg, CH₂Cl₂:AcOEt, 90:10) por TLC preparativa, utilizando como eluente a mistura CH₂Cl₂:MeOH (97,5:2,5; 6 placas). Foram isoladas mais 26 mg deste composto, o que perfaz um total de 34 mg.

Cicloart – 25-eno-3 β ,24-diol



Composto branco cristalino.

p.f. 178-180°C

$[\alpha]_D^{25} = +35^\circ$ (c 0,111, CHCl₃); Lit. $[\alpha]_D^{20} = +48^\circ$ (Dic. Nat. Prod., 1994)

IV $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹ (filme): 3380, 2936, 2870, 1451, 1371, 1027, 897, 755.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 4,95 (*s*, H-27), 4,85 (*s*, H-27), 4,04 (*t*, $J = 6,4$ Hz, H-24), 3,30 (*dd*, $J = 4,4$ e 10,8 Hz, H-3), 1,74 (*s*, Me-26), 0,98* (*s*, Me-18), 0,98* (*s*, Me-29), 0,91 (*s*, Me-28), 0,90 (*d*, $J = 6,8$ Hz, Me-21), 0,83 (*s*, Me-30), 0,57 (*d*, $J = 4,0$ Hz, H-19), 0,35 (*d*, $J = 4,0$ Hz, H-19).

* Sinais sobrepostos

¹³C RMN (100,61 MHz, CDCl₃): δ 147,8 e 147,5 (C-25), 110,9 (C-27), 78,8* (C-3), 78,8* (C-24), 52,2 (C-17), 48,8 (C-14), 48,0 (C-8), 47,1 (C-5), 45,3 (C-13), 40,5 (C-4), 35,9 (C-20), 35,6 (C-12), 32,9 (C-15), 32,0** (C-1), 31,9** (C-22), 31,6 (C-23), 30,4 (C-2), 29,9 (C-19), 28,2 (C-7), 26,4 (C-16), 26,1 (C-11), 26,0 (C-10), 25,4 (C-30), 21,1 (C-6), 20,0 (C-9), 19,3 (C-28), 18,3 (C-21), 18,1 (C-18), 17,2 (C-26), 14,0 (C-29).

* Sinais sobrepostos

** Atribuições permutáveis

EIMS, m/z (int.rel): 442 [M]⁺(4), 427 (5), 424 (10), 409 (20), 315 (67), 313 (5), 302 (16), 175 (48), 173 (35).

A fracção C4 (796 mg, 80:20 a 75:25) foi fraccionada conforme esquematizado na Figura 3.4.

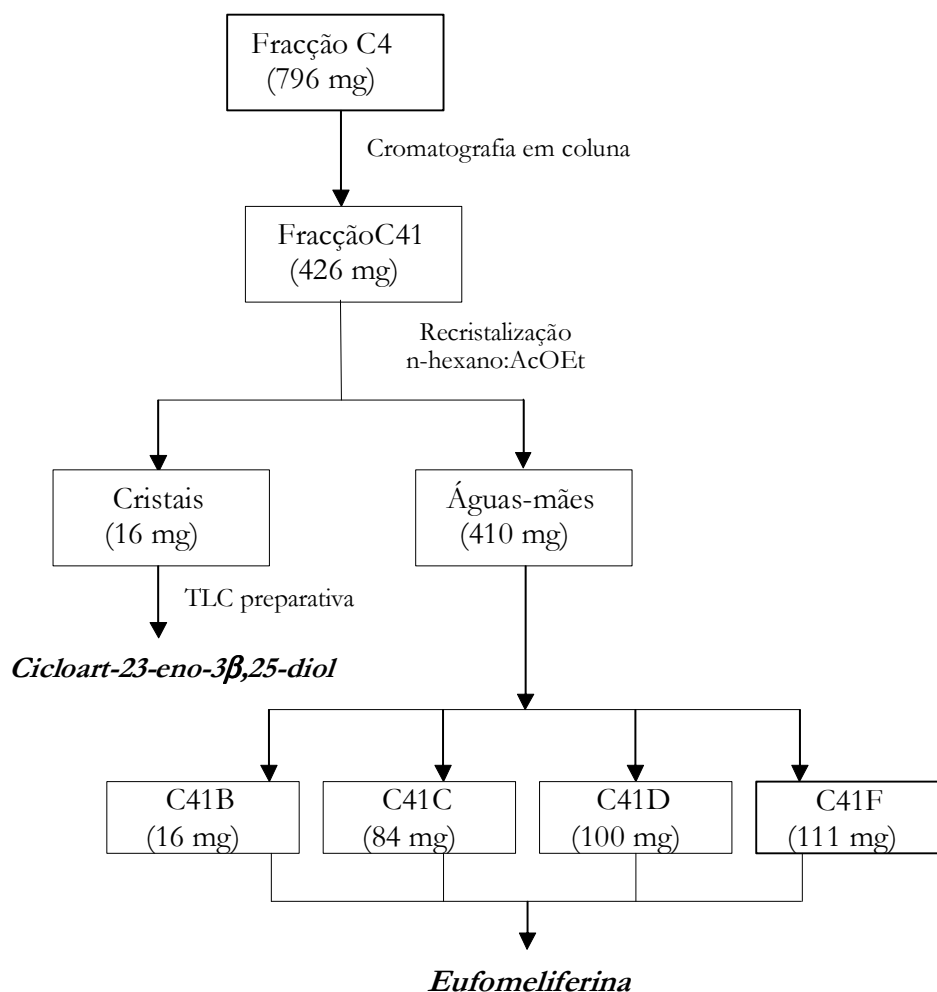
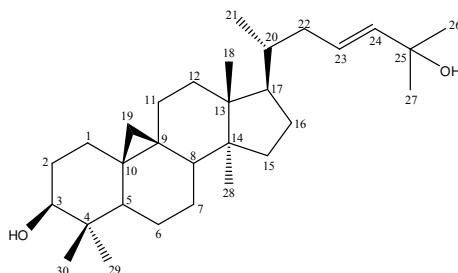


Figura 3.4 – Representação esquemática do estudo da fracção C4.

Procedeu-se à sua cromatografia em coluna de sílica-gel (80 g) com n-hexano: CH₂Cl₂ (100:0 a 87,5:12,5, gradiente de 2,5 %, volume total de eluente 0,8 L; 82,5:17,5 a 47,5:52,5, gradiente 5 %, volume de cada eluente 0,1 L, 40:60 a 0:100, gradiente 10 %, volume de cada eluente 0,1 L) e CH₂Cl₂: MeOH (99,5:0,5 a 98:2, gradiente 0,5 %, volume total de eluente 1,1 L; 97:3 a 95:5, gradiente 1 %, volume total de eluente 0,4 L; 90:10 a 60:40, gradiente de 10 %, volume de cada eluente 0,1 L). A fracção C41 (426 mg, CH₂Cl₂: MeOH, 98,5:1,5) cristalizou do solvente de eluição pelo que foi sujeita a uma nova recristalização (n-hexano:AcOEt). Os cristais obtidos (16 mg) foram purificados por cromatografia em camada fina preparativa (2 placas, CH₂Cl₂:MeOH, 97,5:2,5). Desta purificação obteve-se um composto puro (6 mg), sob a forma de cristais brancos, que foi posteriormente identificado como sendo o cicloart-23-eno-3β,25-diol.

Cicloart – 23-eno-3 β ,25-diol

Composto branco cristalino

p.f. 190-192°C

$[\alpha]_D^{25} = + 25^\circ$ (c 0,010, CHCl_3); Lit. $[\alpha]_D^{25} = + 38^\circ$ (Dic. Nat. Prod., 1994)

IV $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1} (filme): 3350, 2932, 1458, 1372, 1095, 1031, 972, 764.

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 5,62* (s , H-24), 5,61* (s , H-23), 3,30 (dd , $J = 4,0$ e $12,0$ Hz, H-3), 1,33** (s , Me-26), 1,33** (s , Me-27), 0,98*** (s , Me-18), 0,98*** (s , Me-29), 0,90 (s , Me-28), 0,88 (d , $J = 4,0$ Hz, Me-21), 0,83 (s , Me-30), 0,56 (d , $J = 4,0$ Hz, H-19), 0,34 (d , $J = 4,0$ Hz, H-19).

* Atribuições permutáveis

, * Sinais sobrepostos

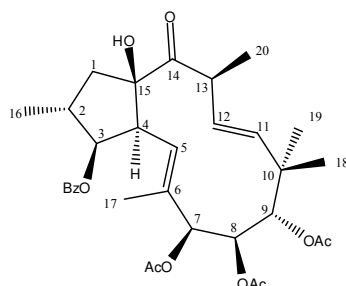
^{13}C RMN (100,61 MHz, CDCl_3): δ 139,3 (C-23), 125,6 (C-24), 78,8 (C-3), 70,8 (C-25), 52,0 (C-17), 48,8 (C-14), 48,0 (C-8), 47,1 (C-5), 45,3 (C-13), 40,5 (C-4), 39,0 (C-22), 36,4 (C-20), 35,6 (C-12), 32,8 (C-15), 32,0 (C-1), 30,4 (C-2), 30,0 (C-19), 29,9 (C-26), 29,9 (C-27), 28,1 (C-7), 26,4 (C-16), 26,1 (C-10), 26,0 (C-11), 25,4 (C-30), 21,1 (C-6), 20,0 (C-9), 19,3 (C-28), 18,3 (C-21), 18,1 (C-18), 14,0 (C-29).

EIMS, m/z (int.rel): 442 $[\text{M}]^+$ (1), 427 (1), 424 (9), 409 (19), 406 (6), 315 (4), 313 (8), 302 (2), 175 (28), 173 (32).

As águas-mães destes cristais (410 mg) continham uma mancha com o comportamento típico dos diterpenos pelo que se recorreu novamente à sua cromatografia em coluna. Utilizaram-se 41 g de sílica e como eluentes misturas de n -hexano: CH_2Cl_2 (100:0 a 0:100, gradiente 5 %, volume total de eluente 3,8 L) e CH_2Cl_2 :MeOH (97,5:2,5 a 95:5, gradiente 2,5 %, volume total de eluente 0,5 L; 90:10 a 60:40, gradiente 10 %, 0,1 L de cada eluente). Os eluídos de volume aproximado de 30 ml foram associados em 6 fracções. Quatro das seis fracções continham o composto de interesse: C41B (16 mg, n -hexano: CH_2Cl_2 , 5:95), C41C (84 mg, CH_2Cl_2), C41D (100 mg, CH_2Cl_2) e C41F (111 mg, CH_2Cl_2 :MeOH, 95:5). Procedeu-se à TLC preparativa de todas estas fracções (15 placas, CH_2Cl_2 :MeOH, 97,5:2,5). Isolou-se um composto amorfo de cor branca (108 mg) que se provou tratar-se de um diterpeno novo com

a estrutura jatrofano posteriormente caracterizado como 7 β ,8 β ,9 α -triacetoxi-3 β -benzoiloxi-15 β -hidroxi-14-oxo-2 β H-jatrofa-5*E*,11*E*-dieno.

Eufomeliferina - 7 β ,8 β ,9 α -triacetoxi-3 β -benzoiloxi-15 β -hidroxi-14-oxo-2 β H,13 α H-jatrofa-5*E*-11*E*-dieno



Composto amorfo branco.

$[\alpha]_D^{20} = +7^\circ$ (c 0.010, CHCl_3)

IV $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1} (filme): 3532, 2966, 1741, 1450, 1373, 1270, 1228, 1052, 716.

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8,13 (*bd*, $J = 8,0$ Hz, H-2' e H-6'), 7,59 (*bt*, $J = 8,0$ Hz, H-4'), 7,53 (*bt*, $J = 8,0$ Hz, H-3' e H-5'), 6,02 (*dd*, $J = 8,0$ e 16,0 Hz, H-12), 5,78 (*d*, $J = 12,0$ Hz, H-5), 5,40 (*d*, $J = 16,0$ Hz, H-11), 5,33 (*s*, H-9), 5,01 (*dd*, $J = 4,0$ e 8,0 Hz, H-3), 4,94 (*s*, H-7), 4,83 (*s*, H-8), 3,66 (*dd*, $J = 8,0$ e 12,0 Hz, H-4), 3,20 (*m*, H-13), 2,84 (*bs*, 15-OH), 2,57 (*m*, H-2), 2,29 (*dd*, $J = 8,0$ e 12,0 Hz, H-1 β), 2,13 (*s*, 9-COCH₃), 2,10 (*s*, 8-COCH₃), 1,77 (*s*, 17-Me), 1,71 (*dd*, $J = 8,0$ e 12,0 Hz, H-1 α), 1,46 (*s*, 7-COCH₃), 1,40 (*d*, $J = 8,0$ Hz, Me-20), 1,29 (*d*, $J = 8,0$ Hz, Me-16), 1,05 (*s*, Me-18), 0,90 (*s*, Me-19).

^{13}C RMN (100,61 MHz, CDCl_3): δ 213,6 (C-14), 170,5 (8-COCH₃), 169,8 (9-COCH₃), 169,2 (7-COCH₃), 165,6 (3-COC₆H₅), 138,6 (C-11), 136,4 (C-6), 133,2 (C-4'), 131,5 (C-12), 129,9 (C-1'), 129,8 (C-2' e C-6'), 128,7 (C-3' e C-5'), 117,7 (C-5), 92,3 (C-15), 84,3 (C-3), 78,4 (C-7), 73,0 (C-9), 69,2 (C-8), 53,0 (C-13), 49,2 (C-1), 49,2 (C-4), 40,7 (C-2), 39,4 (C-10), 23,9 (18-CH₃), 21,5 (19-CH₃), 21,2 (8-COCH₃), 21,2 (9-COCH₃), 20,1 (7-COCH₃), 19,4 (16-CH₃), 16,3 (20-CH₃), 16,1 (17-CH₃).

ESI-MS, m/z (int.rel): 609 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

3.2.6 Estudo da fração D

A fração D (cf. Tabela 3.1) foi fraccionada por cromatografia em coluna de sílica (150 g) e usando como eluente misturas de n-hexano:AcOEt (100:0 a 50:50, gradiente 5 %, volume total de eluente 6,0 L; 40:60 a 100:0, gradiente 10 %, volume de cada eluente 0,3 L;

AcOEt:MeOH 50:50, 0,3 L e 0:100, 0,3 L). Da associação dos eluídos de 75 ml resultaram 7 fracções, das quais quatro foram analisadas.

A fracção D3 (928 mg, n-hexano:AcOEt, 75:25) foi fraccionada por cromatografia em coluna de sílica-gel (100 g), usando como eluente misturas de polaridade crescente de n-hexano:CH₂Cl₂ (50:50 a 0:100, gradiente 10 %, volume de cada eluente 0,2 L) e CH₂Cl₂:AcOEt (98:2, 0,2 L; 96:4, 1,0 L; 95:5 a 80:20, gradiente 2,5 %, volume total de eluente 2,0 L; 75:25, 0,2 L; 70:30 a 50:50, gradiente 10 %, volume de cada eluente 0,2 L; AcOEt:MeOH, 100:0 a 0:100, gradiente 50 %, volume de cada eluente 0,2 L). Os eluídos recolhidos rondavam os 70 ml e foram associados, após controlo do seu perfil cromatográfico por TLC, em 5 fracções das quais 3 foram analisadas (cf. Figura 3.5).

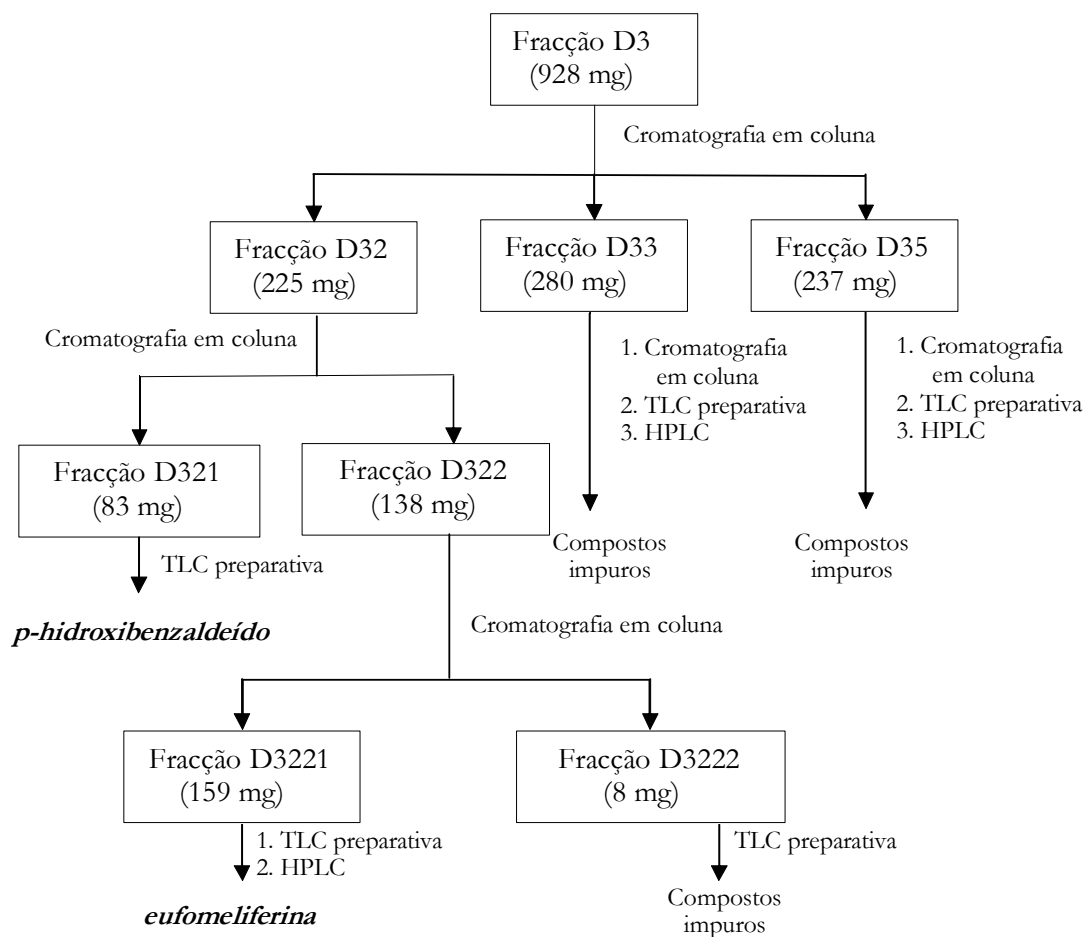
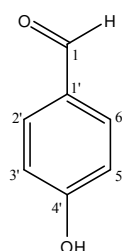


Figura 3.5 – Representação esquemática do estudo da fracção D3.

A fracção D32 (225 mg, CH₂Cl₂: AcOEt, 96:4 a 87,5:12,5) foi sujeita a cromatografia em coluna de sílica-gel (22 g), com n-hexano:CH₂Cl₂ (50:50 a 0:100, gradiente 10 %, volume de cada eluente 0,1 L) e CH₂Cl₂:AcOEt (99:1 a 95:5, gradiente 1 %, volume total de eluente 1,0 L; 92,5:7,5, 0,1 L; 90:10, 0,1 L, 50:50, 0,1 L e AcOEt:MeOH, 100:0 e 50:50, 50 ml). Os eluídos de, aproximadamente, 30 ml foram associados em 2 fracções. Sujeitou-se uma delas, a fracção D321 (83 mg, CH₂Cl₂:AcOEt, 99:1 a 95:5), a TLC preparativa (4 placas, CHCl₃:MeOH, 95:5). Isolaram-se, desta forma, 13 mg de um composto puro que se veio a identificar posteriormente como sendo o *p*-hidroxibenzaldeído.

***p*-hidroxibenzaldeído**



Composto amorfo

IV $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹ (filme): 3448, 1705.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 9,89 (*s*, CH=O), 7,84 (*d*, $J = 8,8$ Hz, H-2' e H-6'), 6,98 (*d*, $J = 8,4$ Hz, H-3' e H-5'), 6,08 (*s*, OH).

¹³C RMN (100,61 MHz, CDCl₃): δ 191,0 (C=O), 161,3 (C-OH), 132,4 (C-2' e C-6'), 130,0 (C-1'), 115,9 (C-3' e C-5').

ESI-MS, m/z (int.rel): 146 [M+1+Na]⁺

A fracção, D322 (138 mg, CH₂Cl₂:AcOEt, 95:5 a 90:10) foi aplicada numa cromatografia em coluna de sílica-gel (15 g) e eluída com misturas de CH₂Cl₂:MeOH (100:0 a 99:1, gradiente 0,5%, volume total de eluente 1,0 L). A associação dos eluídos de, aproximadamente, 15 ml resultou num total de 2 fracções: D3221 e D3222. A fracção D3221 (159 mg, CH₂Cl₂:MeOH, 99:1) foi submetida TLC preparativa (8 placas, CHCl₃:MeOH, 95:5). O seu composto maioritário, D3221A (25 mg), foi posteriormente purificado por HPLC, utilizando como fase móvel MeOH:H₂O (70:30). A sua posterior identificação revelou tratar-se de um diterpeno já isolado previamente na fracção C: a eufomelifarina.

A reduzida quantidade obtida para a fracção D3222 (8 mg, CH₂Cl₂:MeOH, 99:1) levou à sua aplicação numa placa de TLC preparativa, utilizando como fase móvel CHCl₃:MeOH (95:5). Obtiveram-se 2 compostos em quantidades ínfimas, D3222A e D3222C (0,9 e 0,6 mg,

respectivamente) não sendo, conseqüentemente, passíveis de identificação. Obteve-se também um terceiro composto, o D3222B (5 mg), que foi sujeito a RMN, tendo-se verificado tratar-se de uma mistura complexa de triterpenos.

Para o fracionamento da fracção D33 (279,9 mg, CH₂Cl₂:AcOEt, 87,5:12,5 a 82,5:17,5) recorreu-se à cromatografia em coluna, com 20 mg de sílica e misturas de eluentes de n-hexano:CH₂Cl₂ (40:60 a 0:100, gradiente 10 %, volume de cada eluente 100 ml) e CH₂Cl₂:AcOEt (99:1 a 95:5, gradiente 1 %, volume de cada eluente 100 ml; 94:6 a 90:10, gradiente 2 %, volume total de eluente 0,8 L; 85:15 a 80:20, gradiente 5 %, volume de cada eluente 100 ml; 50:50 e 0:100, volume de cada eluente 100 ml). Os eluídos recolhidos de, aproximadamente, 30 ml foram associados em 3 fracções. A análise das três fracções resultantes por TLC preparativa e HPLC, não resultou no isolamento de qualquer composto puro.

A fracção D35 (237 mg) foi sujeita a cromatografia em coluna, TLC preparativa e HPLC originando dois compostos impuros em reduzidas quantidades, o que impossibilitou a sua identificação.

A fracção D4 (1,1 g, n-hexano:AcOEt, 75:25) foi submetida a cromatografia em coluna de sílica-gel (100g), utilizando como eluentes misturas de polaridade crescente de n-hexano:CH₂Cl₂ (100:0 a 0:100, gradiente 10 %, volume de cada eluente 0,2 L) e CH₂Cl₂:AcOEt (99:1 a 92:8, gradiente 1%, volume total de eluente 2,6 L; 90:10 a 75:25, gradiente 2,5 %, volume total de eluente 2,4 L; 70:30, 0,2 L; 50:50, 0,2 L; 0:100, 0,2 L; AcOEt:MeOH, 50:50, 0,2 L e 0:100, 0,2 L). Os volumes recolhidos rondaram os 60 ml, cuja associação, após controlo por TLC, originou 5 sub-fracções (cf. Figura 3.6).

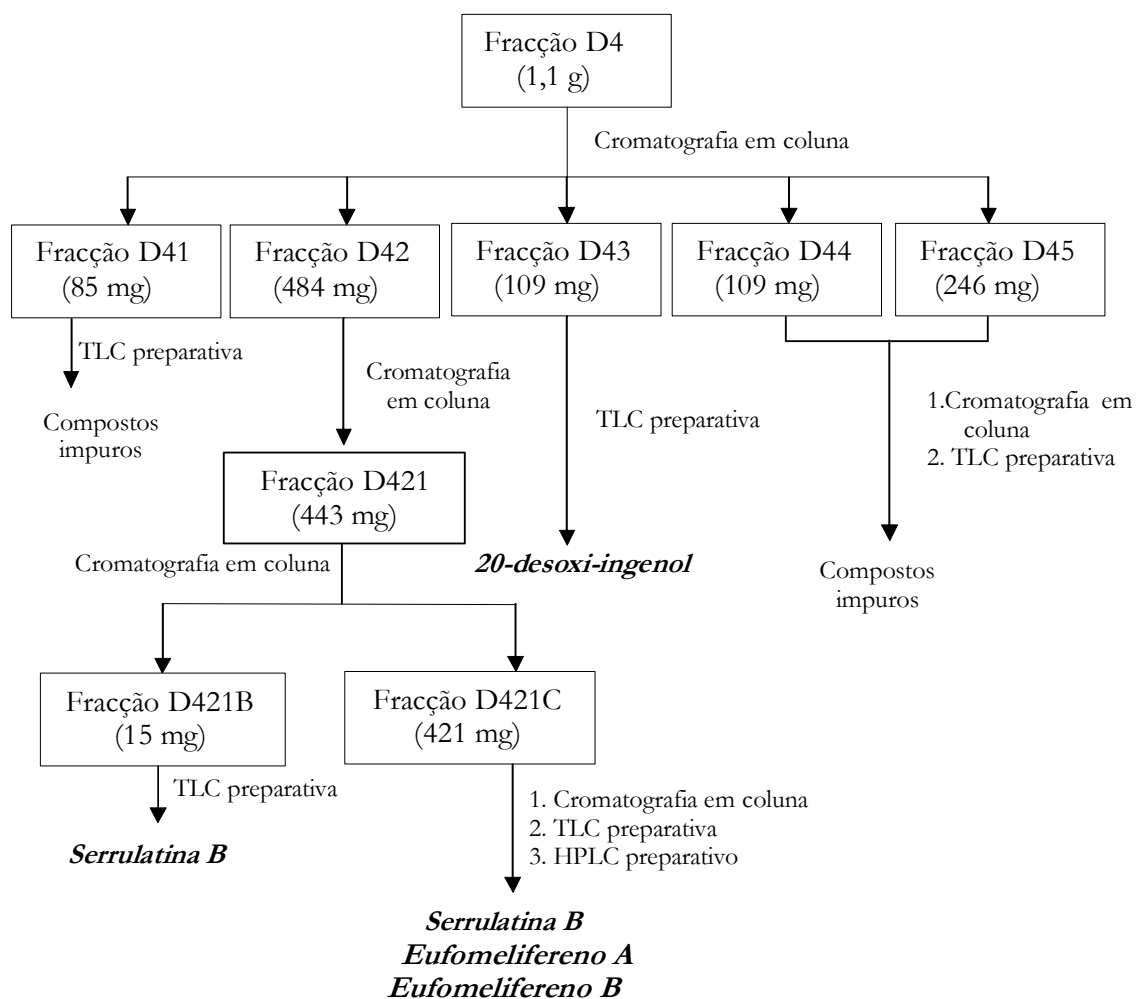


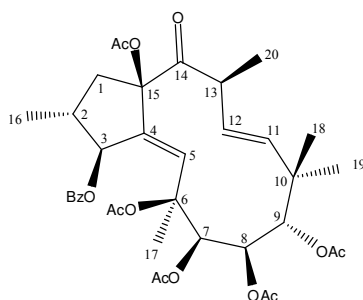
Figura 3.6 – Representação esquemática do estudo da fracção D4.

A fracção D41 (85 mg, CH₂Cl₂:AcOEt, 96:4 a 93:7) foi sujeita a cromatografia preparativa em camada fina mas as reduzidas quantidades obtidas do composto isolado, aliadas ao facto deste ainda não se encontrar totalmente puro, não permitiram a sua identificação.

A fracção D42 (484 mg, CH₂Cl₂:AcOEt, 93:7 a 87,5:12,5) foi sujeita a cromatografia em coluna de sílica-gel (50,4 g) com misturas de n-hexano:AcOEt (100:0 a 96:4, gradiente 1 %, volume de cada eluente 0,15 L; 95:5 a 65:35, gradiente 2,5 %, volume total de eluente 1,5 L; 50:50, 0,1 L; AcOEt:MeOH, 100:0, 0,1 L e 50:50, 0,1 L). Os eluídos recolhidos de, aproximadamente, 30 ml foram associados numa única fracção pelo que se concluiu que a coluna e, em particular, o sistema de solventes utilizado, não foi eficiente. Sendo assim, elaborou-se nova cromatografia em coluna de sílica-gel (45,4g) mas recorrendo a misturas de eluentes constituídas por n-hexano:CH₂Cl₂ (100:0 a 0:100, gradiente 10 %, volume de cada eluente 0,1 L) e CH₂Cl₂:Acetona (99:1 a 95:5, gradiente de 1 %, volume total de eluente 0,9 L;

92,5:7,5 a 87,5:12,5, gradiente 2,5 %, volume de cada eluente 0,1 L). Obtiveram-se 3 frações por associação dos eluídos de cerca de 30 ml, das quais apenas duas apresentaram um perfil cromatográfico justificativo de uma análise posterior: as frações D421B e D421C. Devido à simplicidade do perfil e às reduzidas quantidades do resíduo obtido para a fração D421B (15 mg, CH₂Cl₂:Acetona, 95:5), optou-se pela cromatografia em TLC preparativa para a sua purificação (2 placas, CHCl₃:MeOH, 97,5:2,5). Isolaram-se 7,6 mg de um composto amorfo, que comprovou ser um diterpeno com o esqueleto jatrofano denominado serrulatina B.

***serrulatina B* - 6 β ,7 β ,8 β ,9 α ,15 β -pentacetoxi-3 β -benzoiloxi-14-oxo-2 β H,13 α H-jatrofa-4E,11E-dieno**



Composto amorfo incolor

$[\alpha]_D^{20} = +22^\circ$ (c 0,08, CHCl₃); Lit. $[\alpha]_D^{28} = +25^\circ$ (c 0,055, CHCl₃) (Hohmann *et al.*, 2000)

IV $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹ (filme): 2934, 1740, 1450, 1373, 1249, 1109, 1052, 717.

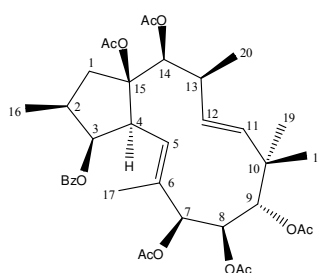
¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8,10 (d , J = 8,2 Hz, H-2' e H-6'), 7,56 (t , J = 7,6 Hz, H-4'), 7,44 (t , J = 7,6 Hz, H-3' e H-5'), 5,92 (s , H-5), 5,78 (dd , J = 9,6 e 16,8 Hz, H-12), 5,76 (d , J = 6,0 Hz, H-3), 5,45 (d , J = 16,8 Hz, H-11), 5,43 (s , H-9), 5,39 (d , J = 2,8 Hz, H-8), 5,26 (d , J = 2,8 Hz, H-7), 3,75 (m , H-13), 2,72 (dd , J = 6,4 e 13,2 Hz, H-1 β), 2,34 (m , H-2), 2,18 (s , 6-COCH₃), 2,15 (s , 15-COCH₃), 2,14 (s , 9-COCH₃), 2,09 (s , 8-COCH₃), 2,06 (s , 7-COCH₃), 2,03 (t , J = 13,2 Hz, H-1 α), 1,50 (s , Me-17), 1,48 (d , J = 7,2 Hz, Me-16), 1,28 (d , J = 6,8 Hz, Me-20), 0,92 (s , Me-18), 0,86 (s , Me-19).

¹³C RMN (100,61 MHz, CDCl₃): δ 204,1 (C-14), 171,1 (15-COCH₃), 170,4 (8-COCH₃), 169,8 (7-COCH₃), 169,7 (6-COCH₃), 169,3 (9-COCH₃), 165,6 (3-COC₆H₅), 141,5 (C-11), 138,3 (C-5), 137,4 (C-4), 133,1 (C-4'), 130,1 (C-1'), 129,9 (C-2' e C-6'), 128,4 (C-3' e C-5'), 126,9 (C-12), 90,5 (C-15), 81,6 (C-6), 77,2 (C-3), 75,9 (C-7), 72,9 (C-9), 67,7 (C-8), 42,9 (C-13), 42,1 (C-10), 40,2 (C-1), 40,1 (C-2), 26,4 (18-CH₃), 24,1 (17-CH₃), 21,9 (6-COCH₃), 21,1 (8-COCH₃), 21,1 (15-COCH₃), 20,9 (9-COCH₃), 20,6 (7-COCH₃), 18,8 (20-CH₃), 18,0 (19-CH₃), 17,2 (16-CH₃).

ESI-MS, m/z (int.rel): 721 [M+Na]⁺

A fracção D421C (421 mg, CH₂Cl₂:Acetona, 95:5 a 87,5:12,5) foi sujeita a cromatografia em coluna de sílica-gel (40 g) usando misturas de n-hexano:CH₂Cl₂ (100:0 a 10:90, gradiente 10 %, volume de cada eluente 0,1 L) e CH₂Cl₂:Acetona (100:0 a 95:5, gradiente 1 %, Volume total de eluente 1,3 L; 92,5:7,5, 0,1 L; 92,5:7,5, 0,1 L; 90:10 a 80:20, gradiente 5 %, volume de cada eluente 0,1 L, 50:50 e 0:100, volume de cada eluente 0,1 L). As 4 fracções resultantes da associação dos eluídos de, aproximadamente, 35 ml (C421C1 – 37 mg, C421C2 – 20 mg, C421C3 – 96 mg, C421C4 – 240 mg) apresentavam um perfil cromatográfico muito semelhante tendo sido todas sujeitas a TLC preparativa (23 placas, CHCl₃: MeOH, 97,5:2,5). Desta forma, isolou-se o que mais tarde se concluiu por RMN tratar-se de uma mistura de compostos. O *r_f* idêntico dos constituintes desta mistura perante vários sistemas de eluentes testados levou à sua separação por HPLC (MeOH:Água, 70:30, 254 nm, 4 ml/min). Foram isolados 3 compostos, identificados posteriormente como sendo a serrulatina B (13 mg), existente também na fracção anterior; o eufomeliferen A (7 mg) e o eufomeliferen B (12 mg).

Eufomeliferen A - 7β,8β,9α,14β,15β-pentacetoxi-3β-benzoiloxi-2αH,13αH-jatrofa-5E,11E-dieno



Pó branco amorfo

$$[\alpha]_D^{20} = -7^\circ (c\ 0.093, \text{CHCl}_3)$$

IV $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹ (filme): 2972, 1740, 1449, 1371, 1237, 1055, 736, 712.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7,97 (*d*, *J* = 7,2 Hz, H-2' e H-6'), 7,55 (*t*, *J* = 7,2 Hz, H-4'), 7,44 (*t*, *J* = 7,6 Hz, H-3' e H-5'), 5,70 (*d*, *J* = 9,2 Hz, H-5), 5,67 (*dd*, *J* = 8,4 e 16,0 Hz, H-12), 5,43 (*t*, *J* = 3,6 Hz, H-3), 5,13 (*s*, H-9), 5,11 (*d*, *J* = 16,0 Hz, H-11), 5,03 (*s*, H-8), 5,01 (*d*, *J* = 2,4 Hz, H-14), 4,94 (*s*, H-7), 3,02 (*dd*, *J* = 3,6 e 9,2 Hz, H-4), 2,59* (*m*, H-1β), 2,59* (*m*, H-2), 2,59* (*m*, H-13), 2,33 (*s*, 15-COCH₃), 2,17** (*s*, 14-COCH₃), 2,13** (*m*, H-1α), 2,08 (*s*, 8-COCH₃), 2,06 (*s*, 9-COCH₃), 1,89 (*s*, Me-17), 1,14 (*s*, 7-COCH₃), 1,00 (*s*, 18-Me), 0,96 (*d*, *J* = 6,4 Hz, Me-16), 0,96 (*d*, *J* = 6,4 Hz, Me-20), 0,87 (*s*, Me-19).

¹³C RMN (100,61 MHz, CDCl₃): δ 171,4 (14-COCH₃), 170,2 (8-COCH₃), 169,4 (15-COCH₃), 169,2 (9-COCH₃), 168,8 (7-COCH₃), 165,0 (3-COC₆H₅), 136,0 (C-11), 132,9

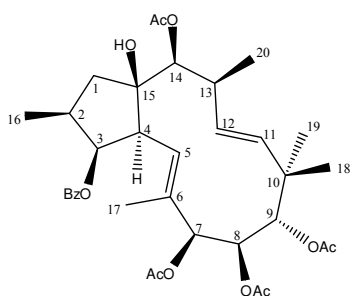
(C-4'), 131,4 (C-6), 130,8 (C-12), 130,0 (C-1'), 129,5 (C-2' e C-6'), 128,5 (C-3' e C-5'), 121,1 (C-5), 91,1 (C-15), 79,5*** (C-3), 79,4*** (C-14), 77,4 (C-7), 72,2 (C-9), 68,2 (C-8), 48,9 (C-4), 43,5 (C-1), 39,4 (C-10), 38,4 (C-13), 37,2 (C-2), 22,5 (15-COCH₃), 22,4 (18-CH₃), 21,0**** (8-COCH₃), 20,9**** (9-COCH₃), 20,8**** (14-COCH₃), 20,4 (19-CH₃), 20,1 (20-CH₃), 19,4 (7-COCH₃), 15,9 (17-CH₃), 13,3 (16-CH₃).

*, ** Sinais sobrepostos

, * Atribuições permutáveis

ESI-MS, m/z (int.rel): 707 [M+Na]⁺

Eufomelifereno B - 7β,8β,9α,14β-tetracetoxi-3β-benzoiloxi-15β-hidroxi-2αH,13αH-jatrofa-5E,11E-dieno



Pó branco amorfo $[\alpha]_D^{20} = -18^\circ$ (c 0,124, MeOH)

IV $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹ (filme): 3373, 3045, 1746, 1595, 810, 752.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8,12 (d, J = 7,6 Hz, H-2' e H-6'), 7,62 (t, J = 7,2 Hz, H-4'), 7,52 (t, J = 7,6 Hz, H-3' e H-5'), 5,95 (dd, J = 8,4 e 15,6 Hz, H-12), 5,82 (d, J = 10,0 Hz, H-5), 5,41 (bs, H-3), 5,18 (s, H-9), 5,08 (s, H-8), 5,06 (d, J = 15,6 Hz, H-11), 4,97 (s, H-14), 4,91 (s, H-7), 3,11 (dd, J = 4,0 e 10,0 Hz, H-4), 2,68 (bs, H-13), 2,22* (H-2), 2,22* (s, 14-COCH₃), 2,12 (t, J = 12,8 Hz, H-1β), 2,06** (s, 8-COCH₃), 2,06** (s, 9-COCH₃), 1,87 (s, H-17), 1,75 (t, J = 12,8 Hz, H-1α), 1,13 (s, 7-COCH₃), 1,00 (s, 18-Me), 0,95*** (bs, Me-16), 0,95*** (bs, Me-20), 0,86 (s, Me-19).

¹³C RMN (100,61 MHz, CDCl₃): δ 171,8 (14-COCH₃), 170,4 (8-COCH₃), 169,7 (9-COCH₃), 169,5 (7-COCH₃), 165,8 (3-COC₆H₅), 134,1 (C-11), 132,8 (C-4'), 132,5 (C-12), 130,1[•] (C-6), 130,0[•] (C-1'), 129,6 (C-2' e C-6'), 128,2 (C-3' e C-5'), 122,7 (C-5), 82,7 (C-15), 81,3 (C-3), 80,8 (C-14), 77,9 (C-7), 72,3 (C-9), 68,2 (C-8), 47,4 (C-1), 47,1 (C-4), 39,0 (C-10), 38,5 (C-13), 36,4 (C-2), 21,7 (18-CH₃), 19,7 (19-CH₃), 19,5**** (7-COCH₃), 19,5**** (8-COCH₃), 19,5**** (14-COCH₃), 18,7 (20-CH₃), 18,5 (9-COCH₃), 14,7 (17-CH₃), 12,6 (16-CH₃).

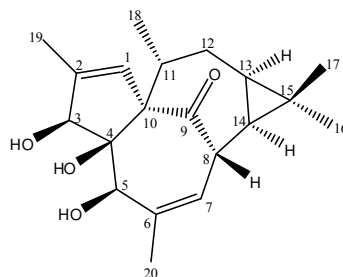
*, **, ***, **** Sinais sobrepostos

[•] Atribuições permutáveis

ESI-MS, m/z (int.rel): 665 [M+Na]⁺

A simplicidade do perfil cromatográfico da fracção D43 resultante (109 mg, CH₂Cl₂: AcOEt, 87,5:12,5 a 82,5:17,5) conduziu ao seu fraccionamento por TLC preparativa (6 placas, CHCl₃:MeOH, 97,5:2,5). Isolaram-se, deste modo, 10 mg de um composto cristalino identificado como sendo o 20-desoxi-ingenol.

20-desoxi-ingenol



Pó branco amorfo

$[\alpha]_D^{20} = -20^\circ$ (c 0,142, CHCl₃)

IV $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹ (filme): 3448, 2915, 1705, 1449, 805.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 6,01 (*s*, H-1), 5,77 (*d*, $J = 3,6$ Hz, H-7), 4,43 (*s*, H-3), 4,04 (*dd*, $J = 3,6$ e 10,8 Hz, H-8), 3,46 (*s*, H-5), 1,87 (*s*, H-19), 1,79 (*s*, H-20), 1,13 (*s*, H-17), 1,08 (*s*, H-16), 1,00 (*d*, $J = 7,6$ Hz, H-18), 0,70 (*q*, $J = 8,0$ Hz, H-13).

¹³C RMN (100,61 MHz, CDCl₃): δ 207,3 (C-9), 138,5 (C-6), 138,3 (C-2), 130,8 (C-1), 123,6 (C-7), 84,5 (C-4), 81,2 (C-3), 76,3 (C-5), 72,4 (C-10), 44,0 (C-8), 40,3 (C-11), 30,9 (C-12), 28,5 (C-16), 24,0 (C-15), 23,2 (C-14), 22,9 (C-13), 22,1 (C-20), 17,2 (C-18), 15,4 (C-17), 15,4 (C-19).

ESI-MS, m/z (int.rel): 355 [M+Na]⁺

As fracções D44 (109 mg, CH₂Cl₂:AcOEt, 82,5:17,5 a 75:25) e D45 (246 mg, CH₂Cl₂:AcOEt, 75:25 a 50:50) foram associadas e sujeitas a cromatografia em coluna, seguida de cromatografia preparativa em camada fina. No entanto, tal não resultou no isolamento de qualquer composto puro pelo que não serão aqui desenvolvidos os procedimentos analíticos em questão.

O estudo da fracção D5 iniciou-se com a cromatografia em coluna do seu resíduo (303 mg, n-Hexano: AcOEt, 75:25 a 70:30). Para tal, usou-se sílica gel (20 g) e misturas de eluentes de n-Hexano:CH₂Cl₂ (40:60 a 0:100, gradiente 10 %, volume de cada eluente 100 ml) e CH₂Cl₂:AcOEt (99:1 a 97:3, gradiente 1 %, volume de cada eluente 100 ml; 95:5 a 80:20,

gradiente 5 %, volume total de eluente 1,2 L; 50:50 e 0:100, volume de cada eluente 100 ml). Os eluídos de aproximadamente 30 ml foram associados em 3 fracções, das quais apenas duas (D51 e D53) foram analisadas (cf. Figura 3.7).

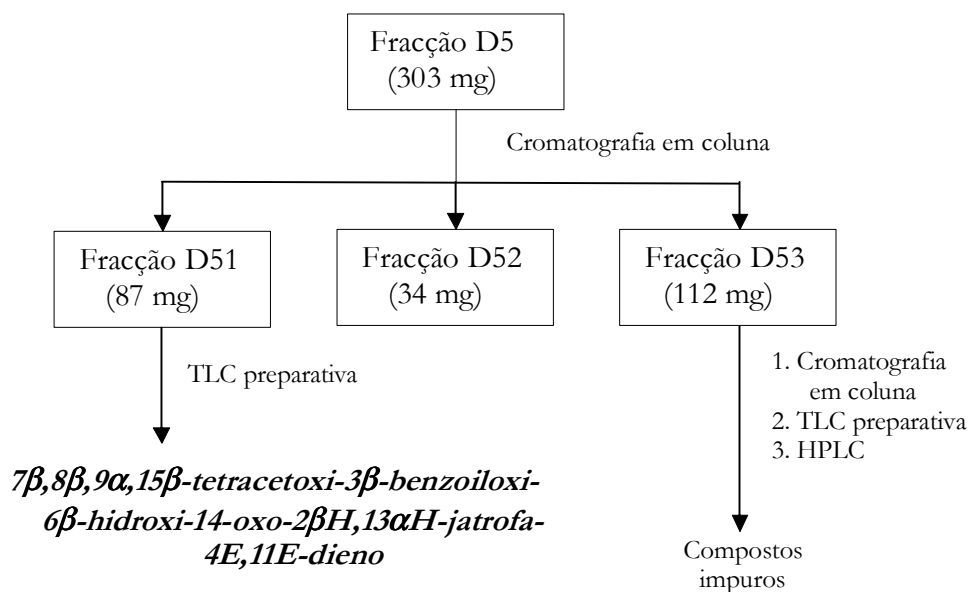
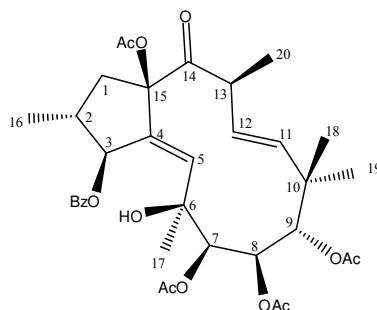


Figura 3.7 – Representação esquemática do estudo da fracção D5.

Um dos constituintes da fracção D51 (87 mg, CH₂Cl₂:AcOEt, 87,5:12,5) absorvia fortemente a 254 e, além disso, corava de um tom castanho escuro com o revelador utilizado. O referido composto (15,4 mg) foi isolado por TLC (5 placas, CHCl₃: MeOH, 95:5) e posteriormente identificado como sendo o 7β,8β,9α,15β-tetracetoxi-3β-benzoiloxi-6β-hidroxi-14-oxo-2βH-jatrofa-4E,11E-dieno.

7β,8β,9α,15β-tetracetoxi-3β-benzoiloxi-6β-hidroxi-14-oxo-2βH,13αH-jatrofa-4E,11E-dieno



Composto branco amorfo

$[\alpha]_D^{20} = -90^\circ$ (c 0.106, CHCl₃); Lit. $[\alpha]_D^{25} = -98^\circ$ (c 0.06, CHCl₃) (Hohmann *et al.*, 2002)

IV $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹ (filme): 3506, 2976, 1733, 1450, 1371, 1252, 1224, 1046, 757, 714.

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8,08 (*d*, $J = 7,6$ Hz, H-2' e H-6'), 7,56 (*t*, $J = 7,6$ Hz, H-4'), 7,44 (*t*, $J = 7,6$ Hz, H-3' e H-5'), 6,01 (*d*, $J = 1,6$ Hz, H-5), 5,88 (*dd*, $J = 1,5$ e 5,9 Hz, H-3), 5,76 (*dd*, $J = 9,2$ e 16,4 Hz, H-12), 5,69 (*s*, H-9), 5,49 (*d*, $J = 16,4$ Hz, H-11), 5,40 (*d*, $J = 2,4$ Hz, H-8), 5,28 (*d*, $J = 2,4$ Hz, H-7), 3,72 (*m*, H-13), 3,04 (*bs*, 6-OH), 2,72 (*dd*, $J = 6,4$ e 13,6 Hz, H-1 β), 2,34 (*m*, H-2), 2,14 (*s*, 9-COCH₃ e 15-COCH₃), 2,10 (*s*, 8-COCH₃), 2,06 (*t*, $J = 13,2$ Hz, H-1 α), 2,02 (*s*, 7-COCH₃), 1,44 (*d*, H=6,8 Hz, Me-16), 1,27 (*d*, $J = 7,2$ Hz, Me-20), 1,14 (*s*, Me-17), 0,93 (*s*, Me-18), 0,88 (*s*, Me-19).

^{13}C RMN (100,61 MHz, CDCl_3): δ 204,1 (C-14), 170,9 (15-COCH₃), 170,4* (8-COCH₃), 170,3* (9-COCH₃), 169,0 (7-COCH₃), 165,5 (3-COC₆H₅), 141,7** (C-5), 141,6** (C-11), 137,8 (C-4), 133,1 (C-4'), 130,1 (C-1'), 129,9 (C-2' e C-6'), 128,4 (C-3' e C-5'), 127,2 (C-12), 90,5 (C-15), 77,4 (C-3), 75,8 (C-7), 73,7 (C-6), 73,7 (C-9), 67,6 (C-8), 43,2 (C-13), 41,6 (C-10), 40,1 (C-1), 40,0 (C-2), 27,9 (17-CH₃), 25,8 (18-CH₃), 21,1 (9-COCH₃), 21,0 (8-COCH₃), 21,0 (15-COCH₃), 20,4 (7-COCH₃), 18,5 (20-CH₃), 18,0 (19-CH₃), 17,0 (16-CH₃).

*, ** Atribuições permutáveis

ESI-MS, m/z (int.rel): 679 [M+Na]⁺

Da fracção D53 (112 mg, CH_2Cl_2 :AcOEt, 87,5:12,5 a 80:20) não se isolaram compostos puros, pelo que não serão aqui desenvolvidas as metodologias adoptadas.

Também do fraccionamento da fracção D6 (676 mg, n-Hexano:AcOEt, 70:30 a 50:50) não resultou qualquer composto puro, mesmo após a sua cromatografia em coluna, placa e HPLC.

3.2.7 Estudo da fracção E

Procedeu-se ao fraccionamento da fracção E (cf. Tabela 3.1) por cromatografia em coluna de sílica-gel (200 g), utilizando com eluente misturas de n-hexano: CH_2Cl_2 (100:0 a 0:100, gradiente 10 %, 0,2 L de cada eluente) e CH_2Cl_2 :MeOH de polaridades crescentes (99:1, 0,2 L; 98:2 a 92:8, gradiente de 0,5 %, volume total de eluente 3,8 L; 90:10 a 80:20, gradiente de 2,5 %, 0,2 L de cada eluente; 75:25 a 40:60, gradiente de 5 %, 0,2 L de cada eluente; 30:70 a 0:100, gradiente de 10 %, volume total de eluente 1 L). Os volumes recolhidos de, aproximadamente, 60 ml foram associados após controlo por TLC, originando 9 fracções. A fracção E4 (0,37g, CH_2Cl_2 : MeOH, 97:3) foi submetida a cromatografia em coluna em sílica-gel (46 g) usando misturas eluentes de CH_2Cl_2 : MeOH de polaridades crescentes (100:0, 0,2 L; 99:1 a 98:2, gradiente de 0,5 %, volume total de eluente de 1,2 L; 97:3 a 95:5, gradiente de 1 %, volume de cada eluente: 0,1 L; 90:10, 0,1 L; 50:50 e 0:100, volume de cada eluente 0,1 L). Os

eluídos recolhidos apresentavam um volume aproximado de 20ml, tendo sido associados em 6 fracções, dependendo da similitude do seu perfil cromatográfico por TLC. O posterior estudo por HPLC analítico de todas as fracções resultantes revelou que os compostos constituintes não apresentavam tempos de retenção típicos dos compostos pretendidos (diterpenos) pelo que não se prosseguiu com análise de nenhuma das fracções.

3.3 Ensaios biológicos

3.3.1 Modulação da multirresistência mediado pela glicoproteína-P em células tumorais

Compostos: Todos os compostos diterpénicos isolados foram sujeitos a este ensaio:

1. Eufomeliferina
2. Eufomelifereno A
3. Eufomelifereno B
4. Serrulatina B
5. 7 β ,8 β ,8 α ,15 β -tetracetoxi-3 β -benzoiloxi-6 β -hidroxi-14-oxo-2 β H,13 α H-jatrofa-4*E*,11*E*-dieno
6. 20-Deoxi-ingenol

Células: Utilizaram-se células de linfoma T de rato L5178 Y (células PAR) transfectadas ou não com o retro-vírus pHa MDR1/A conforme descrito na literatura (Cornwell *et al*, 1987). As células parentais e as transfectadas (cedidas pelo Professor M. Gottesmann, NCI e FDA, USA), foram cultivadas em meio McCoy 5A com 10% de soro de cavalo inactivado, L-glutamina e antibióticos. Ao meio de cultura das células que expressaram o gene MDR1 foram adicionados 60 ng/ml de colchicina de modo a manter a expressão do fenótipo de MDR. A viabilidade das células foi determinada pelo método do azul de tripano.

Corantes e compostos químicos utilizados: rodamina 123 e verapamil (Sigma)

Teste de acumulação da Rodamina 123 (R123): Procedeu-se ao ajuste da densidade das suspensões de células em meio McCoy 5A (sem adição de soro) a 2×10^6 céls/ml e à distribuição de alíquotas de 0,5 ml de cultura de células por tubos Eppendorf. Em seguida, foram adicionados às células 2-20 μ l das soluções *stock* dos compostos em DMSO (1 mg/ml) e incubadas durante 10 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se, em seguida, 10 μ l de Rodamina 123 (concentração final – 5,5 μ M), incubando-se as células 20 minutos a 37°C. Findo este tempo, as células foram lavadas duas vezes e ressuspensas em 0,5 ml de tampão fosfato para análise (PBS). A fluorescência emitida pelas células foi determinada por citometria

de fluxo num aparelho Beckton Dickinson FACScan equipado com um laser de árgon. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram, respectivamente, 488 e 520 nm. Usou-se como controlo positivo o Verapamil e a influência do DMSO nas células foi monitorizado.

A intensidade de fluorescência média foi calculada sob a forma de uma percentagem relativa das linhas de células MDR e PAR comparativamente com células não tratadas. A razão da actividade de fluorescência (R) foi calculada com base nos valores de fluorescência medidos (FL-1) de acordo com a seguinte equação:

$$FAR = \frac{\left[\frac{(FL-1)_{MDR+composto}}{(FL-1)_{MDR\ controla}} \right]}{\left[\frac{(FL-1)_{Parental+composto}}{(FL-1)_{Parental\ controla}} \right]}$$

3.3.2 Actividade anti-proliferativa

O efeito do aumento da concentração dos compostos no crescimento celular foi testado em placas de 96-poços de fundo plano. Os compostos foram diluídos num volume de 50 µl de meio. Em seguida, 1×10^4 células diluídas em 0,1 ml de meio foram adicionadas a cada poço, com excepção dos poços para controlo do meio. As placas de cultura foram incubadas a 37° durante 72 h. No final do período de incubação, 20 µl de uma solução stock a 5 mg/ml de MTT (azul de tiazolilo, Sigma) foram adicionados a cada poço. Após incubação a 37° durante 4h, foram adicionados 100 µl de uma solução de dodecil sulfato de sódio a 10% (Sigma) a cada poço. Em seguida, as placas foram novamente sujeitas a incubação a 37° durante a noite. O crescimento celular foi determinado mediante a medição da densidade óptica (OD) a 550 nm com um leitor ELISA de feixe vertical Dynatech MRX. A inibição do crescimento celular (em percentagem) foi determinada de acordo com a fórmula:

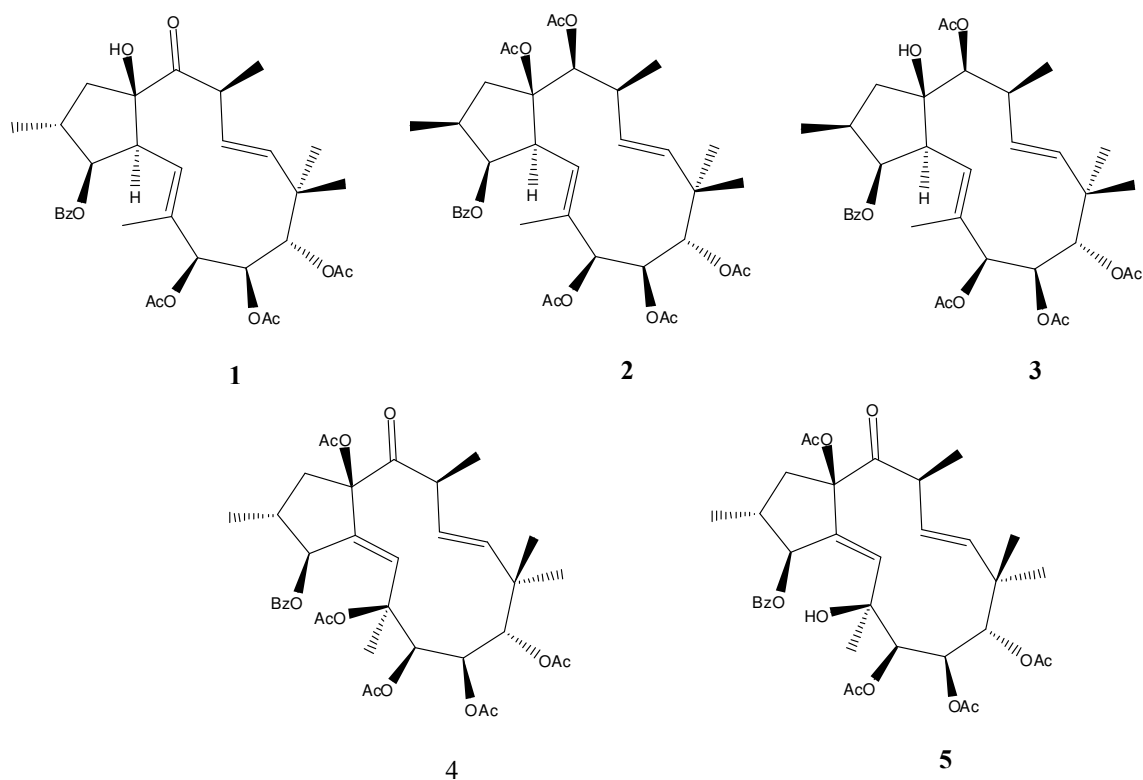
$$100 - \left[\frac{OD_{Amostra} - OD_{meio\ de\ controlo}}{OD_{controlo\ celular} - OD_{meio\ de\ controlo}} \right] \times 100$$

4 CONCLUSÕES

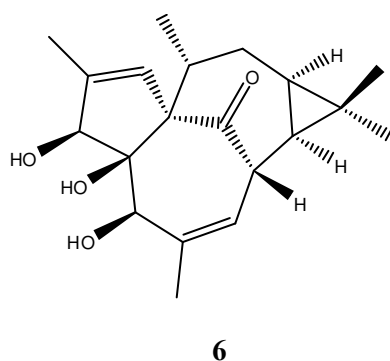
Neste trabalho, procedeu-se ao estudo fitoquímico do extracto metanólico de *Euphorbia mellifera* Ait. com o objectivo de caracterizar os constituintes de natureza diterpénica e avaliar a sua potencial capacidade de reverter o fenómeno de MDR, mediado pela glicoproteína-P, em células cancerígenas.

Do fraccionamento deste extracto foram isolados e caracterizados, através de dados físicos e espectroscópicos (infravermelho, espectrometria de massa, RMN unidimensional - ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, DEPT- e bidimensional - ^1H - ^1H -COSY, HMQC, HMBC e NOESY), onze compostos:

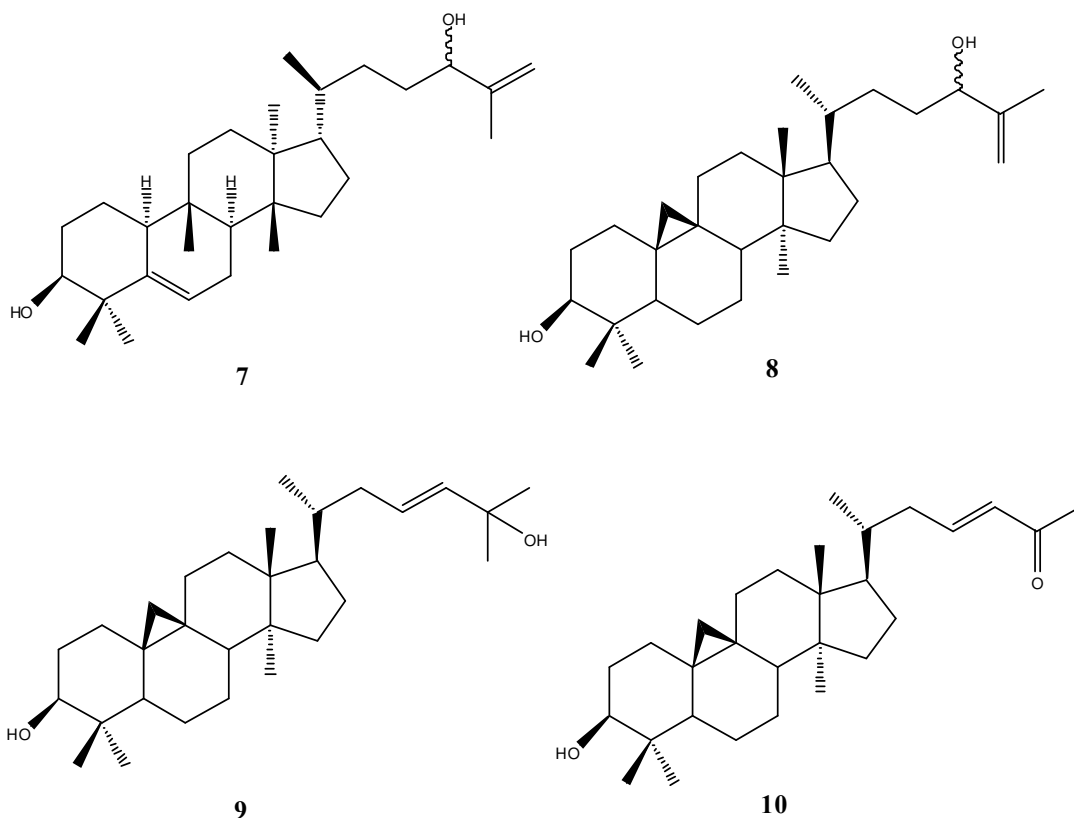
- ✓ Cinco diterpenos macrocíclicos com o esqueleto do jatrofano, três dos quais novos: $7\beta,8\beta,9\alpha$ -triacetoxi- 3β -benzoiloxi- 15β -hidroxi-14-oxo- $2\beta\text{H},13\alpha\text{H}$ -jatrofa- $5E,11E$ -dieno (eufomelifarina, **1**), $7\beta,8\beta,9\alpha,14\beta,15\beta$ -pentacetoxi- 3β -benzoiloxi- $2\alpha\text{H},13\alpha\text{H}$ -jatrofa- $5E,11E$ -dieno (eufomelifereno A, **2**), $7\beta,8\beta,9\alpha,14\beta$ -tetracetoxi- 3β -benzoiloxi- 15β -hidroxi- $2\alpha\text{H},13\alpha\text{H}$ -jatrofa- $5E,11E$ -dieno (eufomelifereno B, **3**); e dois já reportados na literatura: $6\beta,7\beta,8\beta,9\alpha,15\beta$ -pentacetoxi- 3β -benzoiloxi-14-oxo- $2\beta\text{H},13\alpha\text{H}$ -jatrofa- $4E,11E$ -dieno (serrulatina B, **4**) e $7\beta,8\beta,9\alpha,15\beta$ -tetracetoxi- 3β -benzoiloxi- 6β -hidroxi-14-oxo- $2\beta\text{H},13\alpha\text{H}$ -jatrofa- $4E,11E$ -dieno (**5**);



- ✓ Um diterpeno com o esqueleto do ingenano, o 20-desoxi-ingenal;



- ✓ Quatro triterpenos tetracíclicos, um novo com o esqueleto do *abeo*-tirucalano: 19(10→9)-*abeo*-8 α ,9 β ,10 α -tirucal-5,25-dieno-3 β ,24-diol (eufotirucalol, 7); dois cicloartanos: cicloart-25-eno-3 β ,24-diol (8) e cicloart-23-eno-3 β ,25-diol (9); e um *nor*-cicloartano: 27-*nor*-3 β -hidroxícicloart-23-eno-25-ona (10);



✓ Um composto fenólico: o *p*-hidroxibenzaldeído (**11**).

Os compostos **4** e **5** apresentam uma estrutura algo invulgar, com a insaturação em C-4, tendo sido isolados apenas uma vez, em 2000, a partir da espécie *Euphorbia serrulata*.

Os compostos diterpénicos isolados foram sujeitos à avaliação da actividade anti-MDR e anti-proliferativa. Os ensaios foram realizados em colaboração com o Professor Joseph Molnár do Departamento de Microbiologia e Imunobiologia Médica, da Universidade de Szeged na Hungria. Usaram-se células de linfoma T de rato L5178 Y, transfectadas com o retrovírus pHa MDR1/A.

Todos os compostos avaliados revelaram a capacidade de reverter o fenómeno de multirresistência mediada pela Pgp. O eufomelifereno A (**2**) foi o inibidor mais potente, exibindo uma actividade substancialmente superior à do controlo positivo (verapamil). As diferenças encontradas na capacidade moduladora destes compostos parecem estar relacionadas tanto com a lipofilia ($\log P$) como com a capacidade de formação de pontes de hidrogénio.

Por tudo o que foi referido anteriormente, esta dissertação representa um contributo válido e um avanço no sentido da completa caracterização fitoquímica da espécie *Euphorbia mellifera*. Os

resultados dos ensaios biológicos permitiram relacionar a capacidade moduladora da MDR com a lipofilia e com a capacidade de formação de pontes de hidrogénio, tendo-se estes reafirmado como parâmetros indispensáveis a ter em consideração no *design* racional de fármacos com actividade moduladora da multirresistência mediada pela Pgp.

BIBLIOGRAFIA

A

1. Akihisa T, Wijeratne E, Tokuda H, Enjo F, Toriumi M, Kimura Y, Koike K, Nikaido T, Tezuka Y, Nishino H. Eupha-7,9(11),24-trien-3 β -ol (“Antiquol C”) and other triterpenes from *Euphorbia antiquorum* latex and their inhibitory effects on Epstein-Barr virus activation. *J. Nat. Prod.* **65**: 158-162 (2002)
2. Anjaneyulu V, Sambasiva Rao G, Connolly J. Occurrence of 24-epimers of cycloart-25-ene-3 β ,24-diols in the stems of *Euphorbia trigona*. *Phytochemistry* **24** (7): 1610-1612 (1985)
3. Aplin RT, Hornby GM. Application of Mass Spectrometry to the structural investigation of 9,19-Cyclosterols and triterpenes. *J. Chem. Soc.(B)*: 1078-1079 (1966)
4. Appendino G, Jakupovic S, Cesare Tron G, Jakupovic J, Milon V, Ballero M. Macrocyclic diterpenoids from *Euphorbia semiperfoliata*. *J. Nat. Prod.* **61**: 749-756 (1998)
5. Appendino G, Cesare Tron G, Cravotto G, Palmisano G, Jakupovic J. An expeditious procedure for the isolation of ingenol from the seeds of *Euphorbia lathyris*. *J. Nat. Prod.* **62**: 76-79 (1999)
6. Appendino G, Belloro E, Cesare Tron G, Jakupovic J, Ballero M. Diterpenoids from *Euphorbia pithyusa* subsp. *cupanii*. *J. Nat. Prod.* **62**: 1399-1404 (1999a)

7. Appendino G, Porta C, Conseil G, Sterner O, Mercalli E, Dumontet C, Di Pietro A. A new P-Glycoprotein inhibitor from the Caper Spurge (*Euphorbia lathyris*). *J. Nat. Prod.* **66**: 140-142 (2003)
8. Ayatollahi S, Ahmed Z, Malik A, Afza N, Badar Y. Cycloclarkeanol, a new triterpene from *Euphorbia clarkeana*. *J. Nat. Prod.* **55** (7): 959-962 (1992)

B

9. Bach TJ. Some aspects of isoprenoid biosynthesis in plants. *Lipids.* **30**: 191-202 (1995)
10. Bloch K. Sterol molecule: structure, biosynthesis and function. *Steroids.* **57**: 378-382 (1992)
11. Bochar DA, Friesen JA, Stauffacher CV, Rodwell VW. Biosynthesis of mevalonic acid from acetyl-CoA. *Comprehensive Natural Product Chemistry*, Pergamon, Oxford (1999)
12. Boumendjel A, Baubichon-Cortay H, Trompier D, Perrotton T, Di Pietro A. Anticancer Multidrug Resistance Mediated by MRP1: Recent advances in the discovery of reversal agents. *Medicinal Research Reviews.* **25** (4): 453-472 (2005)
13. Braga F, Ayres-Saraiva D, Gattass CR, Capella MAM. Oleanolic acid inhibits the activity of the multidrug resistance protein ABCC1 (MRP1) but not of the ABCB1 (P-glycoprotein): Possible use in cancer chemotherapy. *Cancer Letters.* **248**: 147-152 (2007)
14. Bredel M, Zentner J. Brain-tumour drug resistance: the bare essentials. *The Lancet Oncology.* **3**: 397-406 (2002)
15. Bruneton J. Pharmacognosie: Phytochimie - Plantes Médicinales. *Technique et Documentation – Lavoisier*, 2ª Edição (1993)

C

16. Cabrera G, Seldes A. Hydroperoxycycloartanes from *Tillandsia recurvata*. *Journal of Natural Products* **58** (12): 1920-1924 (1995)
17. Cabrera G, Seldes A. Short side-chain cycloartanes from *Tillandsia usneoides*. *Phytochemistry* **45** (5): 1019-1021 (1997)

18. Dictionary of Natural Products. Chapman& Hall Chemical Database, 1st Edition, Vol. 3, G-L, 1994.
19. Corea G, Fattorusso E, Lanzotti V, Taglialatela-Scafati O, Appendino G, Ballero M, Simon PN, Dumontet C, Di Pietro A. Jatrophone diterpenes as P-glycoprotein inhibitors. First insights of structure activity relationships and discovery of a new, powerful lead. *J. Med. Chem.* **46**: 3395-3402 (2003a)
20. Corea G, Fattorusso E, Lanzotti V, Taglialatela-Scafati O, Appendino G, Ballero M, Simon PN, Dumontet C, Di Pietro A. Modified Jatrophone diterpenes as modulators of Multidrug Resistance from *Euphorbia dendroides* L. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **11**: 5221-5227 (2003b)
21. Corea G, Fattorusso E, Lanzotti V, Motti R, Simon PN, Dumontet C, Di Pietro A. Jatrophone diterpenes as modulators of multidrug resistance. Advances of structure-activity relationships and discovery of the potent lead Pepluanin A. *J. Med. Chem.* **47**: 988-992 (2004)
22. Corea G, Fattorusso C, Fattorusso E, Lanzotti V. Amygdaloidins A-L, twelve new 13 α -OH jatrophone diterpenes from *Euphorbia amygdaloides* L.. *Tetrahedron* **61**: 4485-4494 (2005)

D

23. Darzynkiewicz Z. Detection of apoptosis by flow cytometry. Disponível em <http://www.ishapd.org/1996/1996/073.pdf>
24. Della Greca M, Fiorentino A, Monaco P, Previtera L. Cycloartane triterpenes from *Juncus effusus*. *Phytochemistry* **35** (4): 1017-1022 (1994)
25. Dewick P. The biosynthesis of C₅-C₂₅ terpenoid compounds. *Nat. Prod. Rep.* **19**: 181-222 (2002)
26. Dey P, Harborne J. Methods in plant biochemistry - Terpenoids. *Academic Press* (1991)
27. Dictionary of Natural Products. Chapman & Hall Chemical Database, 1st Edition (1994)

28. Duarte N, Gyémánt N, Abreu P, Molnár J, Ferreira MJU. New macrocyclic lathyrane diterpenes, from *Euphorbia lagascae*, as inhibitors of Multidrug Resistance of tumour cells. *Planta Med.* **72**: 162-168 (2006)
29. Duarte N, Varga A, Cherepnev G, Radics R, Molnár J, Ferreira MJU. Apoptosis induction and modulation of P-glycoprotein mediated multidrug resistance by new macrocyclic lathyrane type diterpenoids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **15**: 546-554 (2007)

E

30. Eisenreich W, Bacher A, Arigoni D, Rohdich F. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences* **61**: 1401-1426 (2004)
31. Evans F, Taylor S. Pro-inflammatory, tumor-promoting and anti-tumor diterpenes of the plant families Euphorbiaceae and Thymelaeaceae. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **44**: 1-99 (1983)
32. Evans WC. Trease & Evans' Pharmacognosy. Saunders, 14th Edition (1996)
33. Evans WC. Trease & Evans' Pharmacognosy. Saunders, 15th Edition (2001)

F

34. Fernandes J, Castilho RA, Rangel da Costa M, Wagner-Souza K, Kaplan MAC, Gattass CR. Pentacyclic triterpenes from Chrysobalanaceae species: cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines. *Cancer Letters* **190**: 165-169 (2003)
35. Fernandes J, Weinlich R, Castilho RA, Kaplan MAC, Amarante-Mendes GP, Gattass CR. Pomolic acid triggers mitochondria-dependent apoptotic cell death in leukemia cell line. *Cancer Letters* **219**: 49-55 (2005)
36. Fernandes J, Weinlich R, Castilho RA, Amarante-Mendes GP, Gattass CR. Pomolic acid may overcome multidrug resistance mediated by overexpression of anti-apoptotic Bcl-2 proteins. *Cancer Letters* **245**: 315-320 (2007)

37. Ferreira MJU. Constituintes químicos de três espécies dos género Euphorbia: *E. mellifera* Ait., *E. peplus* L. e *E. piscatoria* Ait. Tese de Doutoramento, Faculdade de Farmácia – Universidade de Lisboa (1990)
38. Ferreira MJU, Lobo AM, O'Mahoney C, Williams D, Wyler H. Euferol and Melliferol: Two novel triterpenoids from *Euphorbia mellifera*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*: 185-187 (1990)
39. Ferreira MJU, Lobo AM, O'Mahoney C, Williams D, Wyler H. Madeiranes, a new class of pentacyclic triterpenes: D-friedo-madeir-14-en-3 β -ol and -3-one, D:C-friedomadeir-7-en-3 β -ol and -3-one. *Helvetica Chimica Acta* **74** (6): 1329-1338 (1991)
40. Ferreira MJU, Ascenso JR, Tavares OS. Boeticol, a new tetracyclic triterpene from *Euphorbia boetica*. *Journal of Natural Products* **58** (2): 275-279 (1995)

G

41. Gamlath C, Gunatilaka L, Schlemper E. Reissantioloxide: A novel epoxytriterpenoid from *Reissantia indica*; X-ray crystal structure. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*: 249-250 (1988)
42. Gottesman M, Fojo T, Bates S. Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews Cancer* **2** (1): 48-58 (2002)
43. Gottesman M. Mechanisms of Cancer Drug Resistance. *Annu. Rev. Med.* **53**: 615-627 (2002)
44. Günther G, Hohmann J, Vasas A, Máthé I, Dombi G, Jerkovich G. Jatrophone diterpenoids from *Euphorbia esula*. *Phytochemistry* **47** (7): 1309-1313 (1998)

H

45. Halaweish FT, Kronberg S, Hubert MB, Rice JA. Toxic and aversive diterpenes of *Euphorbia esula*. *Journal of Chemical Ecology* **28** (8): 1599-1611 (2002)
46. Higgins CF. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature* **446**: 749-757 (2007)

47. Hohmann J, Vasas A, Günther G, Dombi G, Blazsó G, Falkay G, Máthé I, Jerkovich G. Jatrophone diterpenoids from *Euphorbia peplus*. *Phytochemistry* **51**: 673-677 (1999)
48. Hohmann J, Rédei D, Evanics F, Kálmán A, Argay G, Bartók T. Serrulatin A and B, new diterpenes polyesters from *Euphorbia serrulata*. *Tetrahedron* **56**: 3619-3623 (2000)
49. Hohmann J, Evanics F, Dombi G, Molnár J, Szabó P. Euphosalicin, a new diterpene polyester with multidrug resistance reversing activity from *Euphorbia salicifolia*. *Tetrahedron* **57**: 211-215 (2001)
50. Hohmann J, Molnár J, Rédei D, Evanics F, Forgo P, Kálmán A, Argay G, Szabó P. Discovery and biological evaluation of a new family of potent modulators of multidrug resistance: Reversal of multidrug resistance of mouse lymphoma cells by new natural jatrophone diterpenoids isolated from *Euphorbia* species. *J. Med. Chem.* **45**: 2425-2431 (2002)
51. Hohmann J, Rédei D, Forgo P, Molnár J, Dombi G, Zorig T. Jatrophone diterpenoids from *Euphorbia mongolica* as modulators of the multidrug resistance of L5128 mouse lymphoma cells. *J. Nat. Prod.* **66**: 976-979 (2003)
52. Hohmann J, Forgo P, Csupor D, Schlosser G. Isolation and structure determination of new jatrophone diterpenoids from *Euphorbia platyphyllos* L. *Helvetica Chimica Acta* **86**: 3386-3393 (2003a)
53. Huisman M, Smit J, Schinkel A. Significance of P-glycoprotein for the pharmacology and clinical use of HIV protease inhibitors. *AIDS* **14**: 237-242 (2000)

I

54. Itoh T, Tamura T. 10 α -Cucurbita-5,24-dien-3 β -ol from gourd seed oil. *Lipids* **15**: 122-123 (1980)

J

55. Jakupovic J, Morgenstern T, Bittner M, Silva M. Diterpenes from *Euphorbia peplus*. *Phytochemistry* **47** (8): 1601-1609 (1998a)

56. Jakupovic J, Morgenstern T, Marco JA, Berendsohn W. Diterpenes from *Euphorbia parallias*. *Phytochemistry* **47** (8): 1611-1619 (1998b)
57. Jakupovic J, Jeske F, Morgenstern T, Tsichritzis F, Marco JA, Berendsohn W. Diterpenes from *Euphorbia segetalis*. *Phytochemistry* **47** (8): 1583-1600 (1998c)
58. Jassbi AR. Chemistry and biological activity of secondary metabolites in *Euphorbia* from Iran. *Phytochemistry* **67**: 1977-1984 (2006)
59. Jin J, Shahi S, Kang HK, van Veen HW, Fan TP. Metabolites of ginsenosides as novel BCRP inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **345**: 1308-1314 (2006)

K

60. Kashiwada Y, Wang HK, Nagao T, Kitanaka S, Yasuda I, Fujioka T, Yamagishi T, Cosentino M, Kozuka M, Okabe H, Ikeshiro Y, Hu CQ, Yeh E, Lee KH. Anti-AIDS Agents. Anti-HIV Activity of Oleanolic Acid, Pomolic Acid, and Structurally Related Triterpenoids. *J. Nat. Prod.* **61**: 1090-1095 (1998)
61. Kashiwada Y, Sekiya M, Yamazaki K, Ikeshiro Y, Fujioka T, Yamagishi T, Kitagawa S, Takaishi Y. Triterpenoids from the floral spikes of *Betula platyphylla* var. *japonica* and their reversing activity against Multi-drug resistant cancer cells. *J. Nat. Prod.* **70**: 623-627 (2007)
62. Kim SW, Kwon HY, Chi DW, Shim JH, Park JD, Lee YH, Pyo S, Rhee DK. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by ginsenoside Rg₃. *Biochemical Pharmacology* **65**: 75-82 (2003)
63. Krishna R, Mayer L. Liposomal Doxorubicin circumvents PSC 833-free drug interactions, resulting in effective therapy of multidrug-resistant solid tumors. *Cancer Research* **57**: 5246-5253 (1997)
64. Krishna R, Mayer L. Multidrug resistance (MDR) in cancer – Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **11**: 265-283 (2000)

L

65. Lage H. ABC-transporters: Implications on drug resistance from microorganisms to human cancer. *International Journal of Antimicrobial Agents* **22**: 188-199 (2003)
66. Liscovitch M, Lavie Y. Cancer Multidrug resistance: A review of recent drug discovery research. *IDrugs* **5** (4): 349-355 (2002)
67. Liu LG, Tan RX. New Jatrophone diterpenoid esters from *Euphorbia turczaninowii*. *IDrugs* **5** (4): 349-355 (2002)

M

68. Madureira AM, Ferreira MJU, Gyémánt N, Ugocsai K, Ascenso J, Abreu P, Hohmann J, Molnár J. Rearranged jatrophone-type diterpenes from *Euphorbia* species. Evaluation of their effects on the reversal of Multidrug Resistance. *Planta Med.* **70**: 45-49 (2004a)
69. Madureira AM, Spengler G, Molnár A, Varga A, Molnár J, Abreu P, Ferreira MJU. Effect of cycloartanes on reversal of multidrug resistance and apoptosis induction on mouse lymphoma cells. *Anticancer Research* **24**: 859-864 (2004b)
70. Madureira AM, Molnár A, Abreu P, Molnár J, Ferreira MJU. A new sesquiterpene-coumarin ether and a new abietane diterpene and their effects as inhibitors of P-glycoprotein. *Planta Med.* **70**: 828-833 (2004c)
71. Madureira AM, , Gyémánt N, Ascenso J, Abreu P, Molnár J, Ferreira MJU. Euphoportlandols A and B, tetracyclic diterpene polyesters from *Euphorbia portlandica* and their anti-MDR effects in cancer cells. *J. Nat. Prod.* **69**: 950-953 (2006)
72. Mann J. Secondary Metabolism. *Oxford Science Publications*, 2ª Edição (1992)
73. Mann J. Chemical Aspects of Biosynthesis. *Oxford Chemistry Primers- Oxford Science Publications* (1994)
74. Mans D, Rocha A, Schwartzmann G. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: Targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *The Oncologist* **5**: 185-198 (2000)

75. Mbwambo ZH, Kook Lee S, Mshiu EN, Pezzuto JM, Douglas Kinghorn A. Constituents from the stem wood of *Euphorbia quinquecostata* with Phorbol Dibutyrate receptor-binding inhibitory activity. *J. Nat. Prod.* **59**: 1051-1055 (1996)
76. Marco JA, Sanz-Cervera J, Yuste A. Ingenane and lathyrane diterpenes from the latex of *Euphorbia canariensis*. *Phytochemistry* **45** (3): 563-570 (1997)
77. Marco JA, Sanz-Cervera J, Javier Ropero F, Checa J, Fraga M. Ingenane and lathyrane diterpenes from the latex of *Euphorbia acruensis*. *Phytochemistry* **49** (4): 1095-1099 (1998)
78. Marco JA, Sanz-Cervera J, Yuste A, Jakupovic J. Isoterracinalides A and B, novel bishomoditerpenes lactones from *Euphorbia terracina*. *J. Nat. Prod.* **62**: 110-113 (1999)
79. The Merck Index. Merck Research Laboratories, Merck & Co, Inc., 14th Edition, 2006
80. Molnár J, Gyémánt N, Tanaka M, Hohmann J, Bergmann-Leitner E, Molnár P, Deli J, Didziapetris R, Ferreira MJU. Inhibition of Multidrug Resistance of Cancer Cells by Natural Diterpenes, Triterpenes and Carotenoids. *Current Pharmaceutical Design* **12** (3): 287-311 (2006)
81. Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica CH, Langley J, Cronise P, Vaigro-Wolff A. Feasibility of a high flux anti-cancer drug screen using a diverse panel of cultured human cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **83**: 757-766 (1991)
82. Mulzer J, Giester G, Gilbert M. Towards a total synthesis of macrocyclic diterpenes – Concise route to a highly functionalized cyclopentane key intermediate. *Helvetica Chimica Acta* **88**: 1560-1579 (2005)

N

83. Newman D, Cragg G. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* **70**: 461-477 (2007)

O

84. Ozben T. Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. *FEBS Letters.* **508**: 2903-2909 (2006)

P

85. Parveen M, Khan N, Achari B, Dutta P. A triterpene from *Garcinia mangostana*. *Phytochemistry* **30** (1): 361-362 (1991)
86. Pettit G, Numata A, Iwamoto C, Morito H, Yamada T, Goswami A, Clewlow P, Cragg G, Schmidt J. Antineoplastic agents. 489. Isolation and structures of Meliastatins 1-5 and related Euphane triterpenes from the tree *Melia dubia*. *J. Nat. Prod.* **65**: 1886-1891 (2002)
87. Press JR, Short MJ. Flora of Madeira. Published by The Natural History Museum, London (1994)

Q

88. Qureshi N, Porter JW. Conversion of acetyl-coenzyme A to isopentyl pyrophosphate. *Biosynthesys of isoprenoid compounds*, John Wiley, New York (1981)

R

89. Rabi T; Ramachandran C, Fonseca H, Nair R, Alamo A, Melnick S, Escalon E. Novel drug amooranin induces apoptosis through caspase activity in human breast carcinoma cell lines. *Breast Cancer Research and Treatment* **80**: 321-330 (2003)
90. Ramachandran C, Rabi T, Fonseca H, Melnick S, Escalon E. Novel plant triterpenoid drug amooranin overcomes multidrug resistance in human leukemia and colon carcinoma cell lines. *Int. J. Cancer* **105**: 784-789 (2003)

S

91. SDBS – Spectral Database for Organic Compounds. National Institute of Advanced Industrial Science & Technology (AIST) disponível em http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/cgi-bin/direct_frame_top.cgi?lang=eng (2007)
92. Shapiro A, Ling V. Reconstitution of drug transport by purified P-glycoprotein. *The Journal of Biological Chemistry* **270**: 16167-16175 (1995)
93. Shapiro A, Fox K, Lee P, Yang Y, Ling V. Functional Intracellular P-Glycoprotein. *Int. J. Cancer* **76**: 857-864 (1998)

94. Sikic B, Fisher G, Lum B, Halsey J, Beketic-Oreskovic L, Chen G. Modulation and prevention of multidrug resistance by inhibitors of P-glycoprotein. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **40** (Suppl.): S13-S19 (1997)
95. Silverstein RM, Webster FX. Spectrometric identification of organic compounds. John Wiley & Sons, Inc., 6th Edition (1998)
96. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**: 1107-1112 (1990)
97. Srinivas E, Murthy JN, Rao ARR, Sastry GN. Recent Advances in Molecular Modeling and Medicinal Chemistry Aspects of Phospho-Glycoprotein. *Current Drug metabolism.* **7**: 205-217 (2006)
98. Stavrovskaya A. Cellular mechanisms of Multidrug Resistance of tumor cells. *Biochemistry (Moscow)* **65**, 1: 95-106 (2000)

T

99. Teodori E, Dei S, Scapecchi S, Gualtieri F. The medicinal chemistry of multidrug resistance (MDR) reversing drugs. *Il Farmaco* **57**: 385-415 (2002)
100. Teodori E, Dei S, Martelli C, Scapecchi S, Gualtieri F. The functions and structure of ABC transporters: implications for the design of new inhibitors of Pgp and MRP1 to control multidrug resistance (MDR). *Current Drug Targets* **7**: 893-909 (2006)

U

101. Uemura D, Ohwaki H, Hirata Y. Isolation and structures of 20-deoxyingenol, new diterpene, derivatives and ingenol derivative obtained from "Kansui". *Tetrahedron Letters* **29**: 2527-2528 (1974)
102. Urban M, Sarek J, Kvasnica M, Tislerova I, Hajduch M. Triterpenoid pyrazines and benzopyrazines with cytotoxic activity. *J. Nat. Prod.* **70**: 526-532 (2007)

V

103. Valente C, Ferreira MJU, Abreu P, Pedro M, Cerqueira F, Nascimento MSJ. Three new jatrophane-type diterpenes from *Euphorbia pubescens*. *Planta Med.* **69**: 361-366 (2003)
104. Valente C, Ferreira MJU, Abreu P, Gyémánt N, Ugocsai K, Hohmann J, Molnár J. Pubescenes, jatrophane diterpenes, from *Euphorbia pubescens*, with multi-drug resistance reversing activity on mouse lymphoma cells. *Planta Med.* **70**: 81-84 (2004)
105. Vogg G, Mattes E, Rothenburger J, Hertkorn N, Achatz S, Sandermann Jr. H. Tumor promoting diterpenes from *Euphorbia leuconeura* L. *Phytochemistry* **51**: 289-295 (1999)

W

106. Wang LY, Wang NL, Yao XS, Miyata S, Kitanaka S. Diterpenes from the roots of *Euphorbia kansui* and their *in vitro* effects on the cell division of *Xenopus* (2). *Chem. Pharm. Bull.* **51** (8): 935-941 (2003)
107. Wang RB, Kuo CL, Lien LL, Lien EJ. Structure-activity relationship: analysis of P-glycoprotein substrates and inhibitors. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* **28** (3): 203-228 (2003a)
108. Wiese M, Pajeva IK. Structure-activity relationships of multidrug resistance reversers. *Current Medicinal Chemistry.* **8**: 685-713 (2001)

Y

109. Yamamura S, Kosemura S, Shigeru O, Masatoki I, Yoshihiko S. The isolation and structure of euphoscopins A and B. *Tetrahedron Letters* **22** (52): 5315-5318 (1981)